

Laser-Mikrodissektion in der Analyse regionaler immunologischer und adaptiver Vorgänge bei Infektionskrankheiten in der Gastroenterologie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Christoph Haas
aus Gräfenfing

Gießen 2015

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie
Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb, MA
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter:	Prof. Dr. Roeb
Gutachter:	Prof. Dr. Domann
Tag der Disputation:	06.07.2016

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Laser-Mikrodissektion: Grundlagen und technische Voraussetzungen	1
1.2. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis und chronisch entzündliche Darmerkrankungen	2
1.2.1. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis	2
1.2.2. Morbus Crohn	3
1.2.3. Fragliche Assoziation	4
1.3. Hepatitis-B-Infektion und zelluläre Folgen im Tiermodell	5
1.3.1. Hepatitis-B-Virusgenom und -proteine	5
1.3.2. Endoplasmatischer-Retikulum-Stress als Folge der Akkumulation viraler Proteine	6
1.4. Problemstellung: Quantifizierung von regionalen Unterschieden in der Genexpression	8
1.5. Fragestellung: Anwendbarkeit der Laser-Mikrodissektion auf zwei gastroenterologische Krankheitsmodelle	8
2. Material und Methoden	9
2.1. Laser-Mikrodissektion und konsekutive Nukleinsäureanalyse	9
2.1.1. Reduktion von Ribonukleasen	10
2.1.2. Gefrierschnitte	11
2.1.3. Selektion zu vergleichender Areale und Laser-Mikrodissektion	11
2.1.4. Isolation von RNA aus Mikrodissektaten	11
2.1.5. Spektrophotometrische RNA-Analyse	11
2.1.6. Reverse-Transkription geringer RNA-Mengen	12
2.1.7. Spektrophotometrische cDNA-Analyse	12
2.1.8. Quantitative Real-Time-PCR zur mRNA-Quantifizierung in mikrodissezierten Proben	12
2.1.9. Erstellung von Schmelzkurven zum Nachweis der Spezifität der Reaktion	15
2.1.10. Interpretation von qRT-PCR-Ergebnissen mittels $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode	15
2.2. Tierversuche	16
2.2.1. MAP-infizierte Ziegen	16
2.2.2. LHBs-transgene Mäuse	16
2.3. MAP-Infektion im Jejunum von Ziegen	17
2.3.1. Gesicherte MAP-Infektion bei Ziegen	17

2.3.2.	Molekularbiologische Methoden zum MAP-Nachweis in Mikrodisspektaten	17
2.3.3.	Messung der Zytokinexpression nach MAP-Infektion	21
2.3.4.	Immunhistochemie zur Darstellung von MAP und CD8-positiven Zellen	23
2.4.	LHBs-Produktion in der Leber transgener Mäuse	28
2.4.1.	LHBs-Akkumulation	28
2.4.2.	Laser-Mikrodissektion zur Lokalisierung von ER-Stress	29
2.4.3.	Laser-Mikrodissektion von konzentrischen Zonen um die Vena centralis	30
2.4.4.	Immunhistochemische Visualisierung von ER-Stress-Parametern	33
3.	Ergebnisse	35
3.1.	MAP-Infektion im Jejunum von Ziegen	35
3.1.1.	Molekularbiologischer Nachweis von MAP-DNA	35
3.1.2.	Quantifizierung der Zytokinexpression in betroffenen Arealen	35
3.1.3.	Immunhistochemische MAP-Detektion und CD8-Lokalisation	43
3.2.	LHBs-Expression in der Leber transgener Mäuse	46
3.2.1.	Quantifizierung von regionalen hepatischen ER-Stress-Parametern	46
3.2.2.	Expression von ER-Stress-Parametern in Abhängigkeit von der Entfernung zur Vena centralis	47
3.2.3.	Lokalisation von ER-Stress-Parametern in der Immunhistochemie	54
4.	Diskussion	56
4.1.	MAP-Infektion im Jejunum von Ziegen	56
4.1.1.	MAP-DNA in betroffenen Arealen und Abwesenheit anderer mykobakterieller DNA	56
4.1.2.	Co-Lokalisation von Autofluoreszenz und MAP-Immunfluoreszenzfärbung	57
4.1.3.	Gleichzeitige Detektion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen als MAP-typische Beobachtung	57
4.1.4.	Zytotoxische T-Lymphozyten als mögliche Quelle der Zytokinproduktion	58
4.2.	LHBs-Expression in der Leber transgener Mäuse	58
4.2.1.	Zentrilobuläre Lokalisation von ER-Stress	59
4.2.2.	Einflussfaktoren auf die lokale Verteilung von ER-Stress	62
4.2.3.	Reproduzierbarkeit der Darstellung von ER-Stress in der Immunhistochemie	63

4.2.4. Optimierung der Laser-Mikrodissektion durch immunhistochemische Identifizierung der Zielareale .	63
4.3. Methodenkritik: Laser-Mikrodissektion und konsekutive Nukleinsäureanalyse	64
4.4. Translationale Bedeutung der Befunde	67
5. Zusammenfassung	69
6. Summary	70
Abkürzungsverzeichnis	71
Abbildungsverzeichnis	74
Tabellenverzeichnis	75
Literaturverzeichnis	76
Anhang	93
A. Verwendete chemische Stoffe	94
B. Verwendete Antikörper	96
C. Verwendete Verbrauchsmaterialien	97
D. Verwendete kommerzielle Kits	99
E. Verwendete Primer	100
F. Verwendete DNA-Templates	102
G. Verwendete Geräte	103
H. Verwendete Softwareprodukte	105
Ehrenwörtliche Erklärung	106
Danksagung	107

Kapitel 1.

Einleitung

1.1. Laser-Mikrodissektion: Grundlagen und technische Voraussetzungen

Die Laser-Mikrodissektion wurde 1996 entwickelt und kurz darauf kommerziell verfügbar gemacht ([Emmert-Buck u. a., 1996](#); [Mojsilovic-Petrovic u. a., 2004](#)). Sie ermöglicht die Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen, die von einer einheitlichen Population von Zellen stammen, welche beispielsweise eine krankheitsspezifische Morphologie aufweisen. Prinzipiell wird hierbei ein konventionelles Lichtmikroskop mit einem Niedrigenergie-Laser ausgestattet, um gezielt einzelne Bereiche in einem histologischen Präparat zu selektieren ([Emmert-Buck u. a., 1996](#)), die dann einer weiteren Analyse wie beispielsweise der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zugeführt werden. Für die vorliegende Arbeit wurde ein Laser-Mikrodissektions-System benutzt, das die kontaktfreie und damit kontaminationsarme Auswahl von Gewebeabschnitten ermöglicht (siehe Anhang [G](#), Seite [103](#)). Abbildung [1.1](#) auf Seite [2](#) veranschaulicht den Vorgang: Die Gefrierschnitte werden auf eine thermolabile Membran aufgebracht und so in das Mikroskop eingesetzt, dass die Membran oben, der Schnitt unten zu liegen kommt. Die gewünschten Zellen oder Gewebeeinheiten werden durch Verdampfen der Membran mittels Laser-Energie entlang eines vorher mittels Software (siehe Anhang [H](#), Seite [105](#)) definierten Pfades aus dem Verbund gelöst und in der Verschlusskappe eines unter dem Präparat positionierten Reaktionsgefäßes aufgefangen ([Edwards, 2007](#)).

In der vorliegenden Arbeit soll die Laser-Mikrodissektion auf die Untersuchung der Auswirkungen zweier für den gastroenterologischen Themenbereich relevanten Infektionskrankheiten angewendet werden: die Infektion mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* anhand der Paratuberkulose in Ziegen, sowie der Hepatitis-B-Virus-Infektion anhand eines Maus-Modells der viralen Proteinakkumulation.

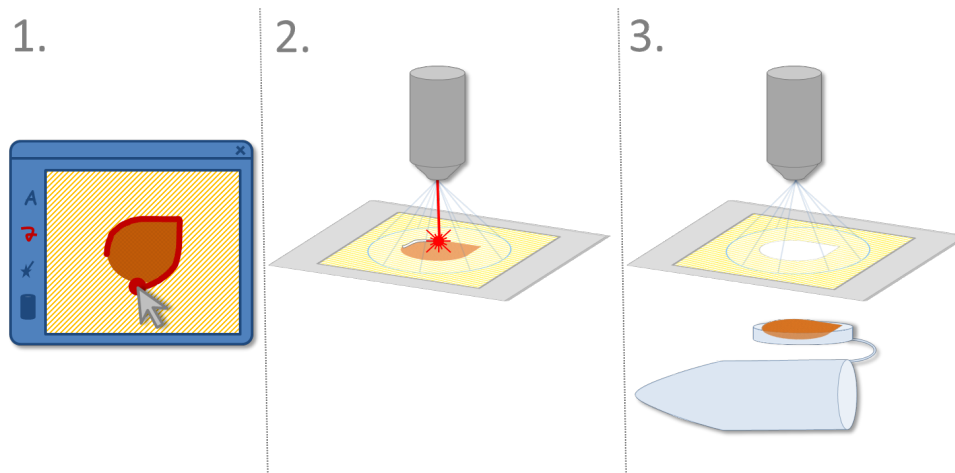


Abbildung 1.1.: Prinzip der Laser-Mikrodissektion: Automatische Laser-Mikrodissektion (2) entlang einer vorher mittels Software definierten Schnittlinie (1), und Probensammlung im Deckel eines Reaktionsgefäßes (3).

1.2. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis und chronisch entzündliche Darmerkrankungen

1.2.1. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis

Das *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) ist in Wiederkäuern der Auslöser für die namensgebende Paratuberkulose, auch Johne-Krankheit genannt, die überwiegend im Dünndarm zu einer chronisch-granulomatösen Enteritis führt ([Lefrançois u. a., 2011](#); [Momotani u. a., 2012](#)). MAP ist ein Mikroorganismus des *Mycobacterium-avium*-Komplex (MAC). Zu diesem werden auch *Mycobacterium avium* subspecies avium (MAA), *Mycobacterium avium* subspecies hominissuis (MAH) sowie *Mycobacterium avium* subspecies silvaticum (MAS) gezählt ([Turenne u. a., 2007](#)). MAA und MAH können infektiöse tuberkulose-ähnliche Läsionen bei zahlreichen Spezies verursachen, etwa beim Rhesusaffen bzw. Wildschwein ([Biet u. a., 2005](#)). Eine disseminierte Infektion mit Erregern aus dem MAC gilt darüber hinaus als eine das erworbene Immundefizienzsyndrom (AIDS) definierende opportunistische Erkrankung ([Lee u. a., 2013](#)). Die Subspezies von *Mycobacterium avium* können molekularbiologisch mittels spezifischer Insertionssequenzen (IS) differenziert werden (siehe Abschnitt 4.1.1, Seite 56).

MAP wird bei oraler Aufnahme durch M-Zellen (Mikrofolten-Zellen), welche Antigene und Mikroorganismen zum lymphatischen Gewebe transportieren ([Bockman u. Cooper, 1973](#); [Mabbott u. a., 2013](#)), und offenbar auch direkt in Enterozyten aufgenommen ([Ponnusamy u. a., 2013](#)). Im Rahmen der Immunabwehr wird das obligat intrazelluläre Mykobak-

terium von Makrophagen rezeptorvermittelt phagozytiert (Rosenfeld u. Bressler, 2010; Sohal u. a., 2008).

Das Überleben von Mykobakterien in phagozytiertem Zustand ermöglicht unter anderem die Fähigkeit zur Beeinflussung von zellulären Signalwegen zur Einschränkung der Phagosom-Reifung (Weiss u. Souza, 2008) und Aufrechterhaltung der Verbindung zum frühen Endosom mit Blockade der Lysosom-Fusion (Rumsey u. a., 2006). Mykobakterien sind zudem in der Lage sich in Phagosomen zu vermehren (Weiss u. Souza, 2008).

Im Rahmen der adaptiven Immunantwort kommt es zu einer Aktivierung von T-Lymphozyten durch antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen (Stabel, 2006). In der Folge werden diverse Zytokine ausgeschüttet, wobei zwischen proinflammatorischen, die tendenziell vom T_H1 -Subtyp der T-Helferzellen ausgeschüttet werden, und antiinflammatorischen Zytokinen differenziert werden kann, welche vom T_H2 -Subtyp freigesetzt werden (Berger, 2000):

- **Interferon γ** (IFN- γ) ist das wichtigste T_H1 -Zytokin (Berger, 2000) und spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle von mykobakteriellen Infektionen (Stabel, 2006). IFN- γ führt zur verstärkten Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aus Makrophagen (Sato u. a., 1998). Die übermäßige Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen kann unter anderem auf diesem Weg zu Gewebeschäden führen (Stabel, 2006).
- **Interleukin 12** (IL-12) führt zu einer T_H1 -Polarisierung, verstärkt also die Differenzierung von naiven T-Helferzellen zum T_H1 -Subtyp und bewirkt hierdurch eine Produktion von IFN- γ (Kidd, 2003). Zudem ist IL-12 an der Aktivierung von Cluster-of-differentiation-8 (CD8)-positiven T-Lymphozyten, also zytotoxischen T-Zellen oder natürlichen Killerzellen beteiligt (Valenzuela u. a., 2002).
- **Interleukin 10** (IL-10) ist den T_H2 -Zytokinen zuzuordnen und inhibiert die Produktion von IFN- γ durch T_H1 -Zellen. Es zählt damit zu den antiinflammatorischen Zytokinen (Kidd, 2003).

Abbildung 1.2 auf Seite 4 bietet eine Übersicht zur T_H1/T_H2 -Differenzierung.

Im Verlauf der manifesten Paratuberkulose tritt ein ausgedehnter Epithelschaden ein, sowie eine Verdickung der Darmwand mit Lymphadenitis und zahlreichen Granulomen (Clarke u. Little, 1996; Whittington u. a., 2012). Daraus resultieren chronische Diarrhoe (Clarke, 1997) und Malabsorption mit progressiver Kachexie (Allen u. a., 1974).

1.2.2. Morbus Crohn

Die zu den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) zählende Enterocolitis regionalis, zumeist als Morbus Crohn bezeichnet, ist ei-

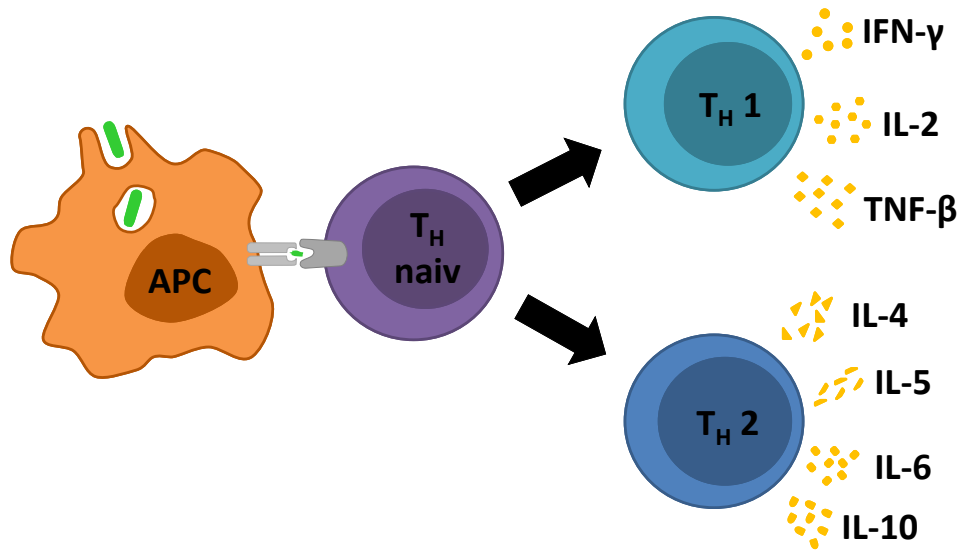


Abbildung 1.2.: Übersicht zur T_H1/T_H2 -Differenzierung von T_H -Zellen (vereinfacht nach [Kapsenberg, 2003](#); [Stabel, 2006](#); [Harding u. Boom, 2010](#)). Nach der Antigen-Präsentation durch die antigen-präsentierende Zelle (APC) kommt es zur Differenzierung der naiven T-Helferzelle (T_H naiv) zur T_H1 -Zelle mit Produktion von Interferon γ (INF- γ), Interleukin 2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor β (TNF- β) oder T_H2 -Zelle mit Produktion von Interleukin 4 (IL-4), 5 (IL-5), 6 (IL-6) und 10 (IL-10)

ne idiopathische Systemerkrankung, die potenziell jeden Darmabschnitt und jede Schicht der Organwand befallen kann ([Crohn, 1932](#); [Rosenfeld u. Bressler, 2010](#); [Cheifetz, 2013](#)). Die Prävalenz für Europa wird mit 322 pro 100.000 Personen angegeben, weltweit geht man von einer steigenden Inzidenz und Prävalenz aus ([Molodecky u. a., 2012](#)). Die Erkrankung geht mit abdominellen Beschwerden und schleimiger, eventuell blutiger Diarrhoe einher ([Baumgart u. Sandborn, 2012](#)). Zu den Komplikationen gehören Fisteln, Strikturen und Perforationen ([Cheifetz, 2013](#)). Daneben treten extraintestinale Manifestationen wie Arthritis, aphtöse Stomatitis, Uveitis und Hautveränderungen wie Pyoderma gangraenosum auf ([Vavricka u. a., 2010](#)).

1.2.3. Fragliche Assoziation

Bereits 1913 brachte [Dalziel](#) die chronisch-interstitielle Enteritis, die später als Morbus Crohn bekannt werden sollte ([Corman, 1989](#)), aufgrund von histomorphologischer Ähnlichkeit mit Paratuberkulose in Verbindung. [Ryan u. a.](#) konnten 2002 in sechs von 15 Fällen in laser-mikrodissezierten Granulomen von Morbus-Crohn-Patienten die MAP-spezifische

IS900-DNA nachweisen. [Toracchio u. a. \(2008\)](#) gelang der molekularbiologische IS-Nachweis in einem von 26 Biopaten von Morbus-Crohn-Patienten. Analog zum Befund bei MAP-infizierten Rindern ([Sweeney u. a., 1992](#)), konnte in der Muttermilch von Morbus-Crohn-Patientinnen MAP kulturell nachgewiesen werden ([Naser, 2000](#)). Zusammenfassend zeigte eine Meta-Analyse von 28 Fall-Kontroll-Studien ([Feller u. a., 2007](#)), dass ein Nachweis von MAP-DNA häufiger bei Morbus-Crohn-Patienten gelang als bei Patienten mit Colitis ulcerosa oder Personen ohne CED. Gegen einen Zusammenhang zwischen Morbus Crohn und einer MAP-Infektion sprechen hingegen, dass [Jones u. a. \(2006\)](#) bei Personen, die Kontakt zu Paratuberkulose-kranken Rindern hatten, keine höhere Prävalenz von CED verzeichnen konnten. Zudem zeigte sich in einer randomisierten, kontrollierten Studie von [Selby u. a. \(2007\)](#) kein Nutzen einer kalkulierten Antibiotika-Therapie bei Morbus Crohn hinsichtlich der Verhinderung weiterer Krankheitsschübe. Nachdem MAP in pasteurisierter Milch ([Grant u. a., 2002](#)) und sogar Trinkwasser ([Mishina u. a., 1996](#)) nachgewiesen wurde und damit von einer allgemein hohen Exposition auszugehen ist, könnte der Nachweis von MAP bei Morbus Crohn-Patienten als klinisch nicht relevanter Nebenfund angesehen werden. Es bleibt offen, ob MAP der Auslöser für eine pathologische Immunantwort ist, die entzündliche Prozesse bedingt, eine Immundefizienz bei Morbus Crohn Infektionen generell begünstigt ([Dieckgraefe u. Korzenik, 2002](#)) oder die Ätiologie von Morbus Crohn unabhängig von pathogenen Keimen ist ([Podolsky, 2002](#)).

1.3. Hepatitis-B-Infektion und zelluläre Folgen im Tiermodell

Weltweit sind 350 Millionen Menschen chronisch mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) infiziert ([Nguyen u. a., 2009](#)). Chronische Hepatitis-B geht mit einem erhöhten Risiko für Leberzirrhose und hepatozelluläres Karzinom (HCC) einher ([Aspinall u. a., 2011](#)). An den Spätfolgen sterben jährlich etwa 790.000 Infizierte ([Lozano u. a., 2012](#)).

Auf zellulärer Ebene kann eine chronische Infektion ihren Ausdruck in Entzündung und oxidativem Stress finden. Begleitet von lokaler Hypoxie, der Umwandlung von epitheliale Gewebe in mesenchymales Gewebe und Angiogeneese kommt es zur Entstehung von Fibrose und schließlich Zirrhose ([Arzumanyan u. a., 2013](#)).

1.3.1. Hepatitis-B-Virusgenom und -proteine

Das HBV ist ein DNA-Virus aus der Familie der Hepadnaviridae ([Glebe u. Urban, 2007](#)), dessen Replikation über eine RNA-Zwischenstufe erfolgt ([Gerlich, 2013](#)). Es verfügt über ein Genom von etwa 3 Kilobasen ([Tiollais u. a., 1985](#)). Während einer Infektion lassen sich Virusbestandteile

und gelegentlich Virione, proteinbehüllte Partikel, im Serum nachweisen. Abbildung 1.3 auf Seite 7 illustriert den Replikationszyklus des HBV. Die ringförmige DNA, welche in den Kernen infizierter Zellen als Minichromosom vorliegt (Levrero u. a., 2009), kodiert für die viralen Proteine:

- Das Oberflächenprotein HBsAg (hepatitis B surface antigen), ein Transmembran-Protein der Virushülle (Arzumanyan u. a., 2013), auch als kleines Oberflächenprotein SHBs (small hepatitis B surface protein) bezeichnet, ist das Translationsprodukt von Gen S. Daneben besteht die Hülle aus dem mittelgroßen MHBs (middle hepatitis B surface protein) und dem großen Hepatitis-B-Oberflächenprotein LHBs (large hepatitis B surface protein), Produkte aus pre-S2- und Gen-S-Regionen beziehungsweise pre-S1-, pre-S2- und Gen-S-Regionen (Yokosuka u. Arai, 2006).
- Gen C kodiert für das Kernprotein HBcAg (Hepatitis B core antigen), aus dem das Nukleokapsid des Virus besteht (Arzumanyan u. a., 2013).
- Da die HBV-Replikation über eine prägenomische RNA-Zwischenstufe entsteht (Arzumanyan u. a., 2013), verfügt das HBV über das P-Protein, dem Produkt des P-Gens, das eine DNA-Polymerase-, Reverse-Transkriptase- und RNase-H-Aktivität aufweist (Radziwill u. a., 1990).
- Das X-Protein, auch als HBx (hepatitis B X protein) bezeichnet, für das das X-Gen kodiert, ist ein multifunktionales regulatorisches Protein, das unter anderem in Transkription, Proteinabbau und Signalwege eingreift (Murakami, 2001). In HBx-transgenen Mäusen induziert es HCC (Kim u. a., 1991).

1.3.2. Endoplasmatischer-Retikulum-Stress als Folge der Akkumulation viraler Proteine

Die HBV-Oberflächenantigene verursachen durch ihre Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum (ER) ER-Stress und lösen eine als „unfolded protein response“ (UPR) bezeichnete zelluläre Antwort auf diese Belastung aus (Chemin u. Zoulim, 2009; Li u. a., 2011). Im Rahmen von UPR werden über verschiedene Signalwege fehlgefaltete Proteine abgebaut, sowie Inhalt und Kapazität des ER erweitert. Beim Versagen dieser Adaptationsvorgänge kommt es zur Apoptose, die durch Calcium-Verschiebung, oxidativen Stress oder Transkriptionsfaktoren vermittelt werden kann (Malhi u. Kaufman, 2011). Im Mausmodell einer chronischen Hepatitis-B wurde die Hochregulation von Genen, die an der Mobilisation von intrazellulärem Calcium beteiligt sind (Barone u. a., 2006), sowie Hinweise auf oxidativen Stress im Sinne einer Produktion von ROS

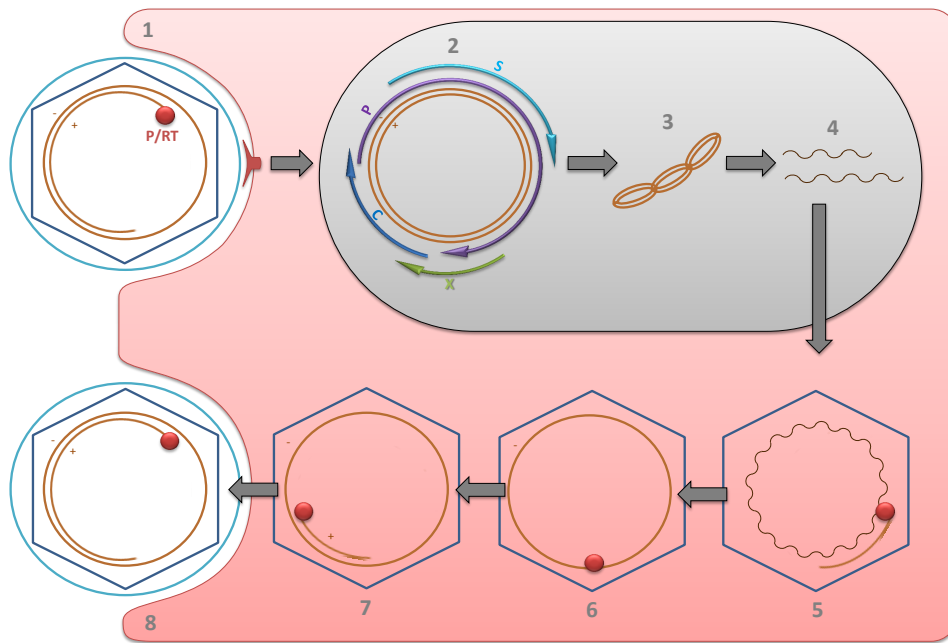


Abbildung 1.3.: Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus (vereinfacht dargestellt; nach [Tiollais u. a., 1985](#), [Yokosuka u. Arai, 2006](#), [Glebe u. Bremer, 2013](#) und [Arzumanyan u. a., 2013](#)). +: DNA-(+)-Strang; -: DNA-(-)-Strang; **P/RT**: Polymerase/ reverse Transkriptase; **P**: P-Region; **S**: prä-S1/S2 und Gen-S; **X**: X-Gen; **C**: Gen C. **1**: Rezeptorvermittelte Endozytose des Virions in den Hepatozyten und Transport in den Zellkern. **2**: Vorliegen als doppelsträngige offene DNA, schematisch dargestellt sind ebenfalls die Genorte auf dem DNA-(-)-Strang. **3**: Vorliegen als kovalent geschlossene zirkuläre DNA. **4**: RNA-Prägenom. **5**: Synthese des (-)-Strangs. **6**: vollständiger (-)-Strang. **7**: Synthese des (+)-Strangs. **8**: Sekretion des vollständigen Virions mit Genom, Kapsid und Hülle.

([Hagen u. a., 1994](#); [Yang u. a., 2008](#)) nachgewiesen. Zu den bei persistierendem ER-Stress verstärkt aktivierten Transkriptionsfaktoren gehören ATF-3 und DDIT-3:

- **ATF-3**: Als Mitglied der ATF/CREB-Gruppe (activating transcription factor/ cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein; [Liu u. a., 2013](#); [Jiang u. a., 2004](#)) ist das für das gleichnamige Protein kodierende Gen ATF-3 bei der eukaryoter-Initiationsfaktor-2-Kinase-(eIF-2-Kinase)-assoziierten Antwort auf ER-Stress von Bedeutung ([Jiang u. a., 2004](#)). eIF-2-Phosphorylierung führt durch eine verminderte globale Proteinsynthese zu einer Entlastung des endoplasmatischen Retikulums ([Malhi u. Kaufman, 2011](#)).

- **DDIT-3:** Das Gen GADD153 (growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153) kodiert für CHOP (C/EBP homologous protein-10; [Zinszner u. a., 1998](#)), auch als DDIT-3 bekannt (DNA-damage inducible transcript 3; [Sims-Robinson u. a., 2012](#)). CHOP ist ein Transkriptionsfaktor ([Malhi u. Kaufman, 2011](#)), der infolge von ER-Stress exprimiert wird ([Wang u. a., 1996](#); [Zinszner u. a., 1998](#); [Li u. Holbrook, 2004](#)) und Teil eines pro-apoptotischen Signalwegs darstellt ([Malhi u. Kaufman, 2011](#)).

1.4. Problemstellung: Quantifizierung von regionalen Unterschieden in der Genexpression

Mittels Immunhistochemie (IHC) oder In-situ-Hybridisierung (ISH) sind immunologische und adaptive Vorgänge in Reaktion auf eine Infektion der Verdauungsorgane bereits bestimmten Regionen im Gewebe zugeordnet worden (siehe [Lybeck u. a., 2013](#) für MAP bzw. [Chemin u. a., 1996](#) für HBV). In der vorliegenden Arbeit soll eine Objektivierung dieser Befunde im Sinne einer Quantifizierung erfolgen, die mittels der genannten Methoden lediglich semiquantitativ möglich ist.

1.5. Fragestellung: Anwendbarkeit der Laser-Mikrodissektion auf zwei gastroenterologische Krankheitsmodelle

Hauptfragestellung (LMD): Das Ziel der Arbeit ist die Etablierung der Anwendung von Lasermikrodissektion mit konsekutiver Nukleinsäureanalyse auf zwei Modelle für gastroenterologische Infektionskrankheiten und Beurteilung der Aussagekraft der Ergebnisse.

Nebenfragestellung 1 (MAP): Darstellung der Immunantwort in infizierten Arealen anhand der Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine infolge einer zellulären Infektion mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

Nebenfragestellung 2 (HBV): Darstellung der regionalen Ausprägung der ‚unfolded protein response‘ im Modell einer Hepatitis-B-Virus-Infektion.

Kapitel 2.

Material und Methoden

2.1. Laser-Mikrodissektion und konsekutive Nukleinsäureanalyse

Der grundsätzliche Ablauf eines Mikrodissektions-Versuches mit konsekutiver Genexpressionsanalyse ist in Abbildung 2.1 auf Seite 9 dargestellt: Aus dem gefrorenen Präparat wurden Gefrierschnitte hergestellt und gefärbt, diese lasermikrodisseziert, aus dem gewonnenen Material RNA isoliert, in komplementäre DNA umgewandelt und einer quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) zugeführt.

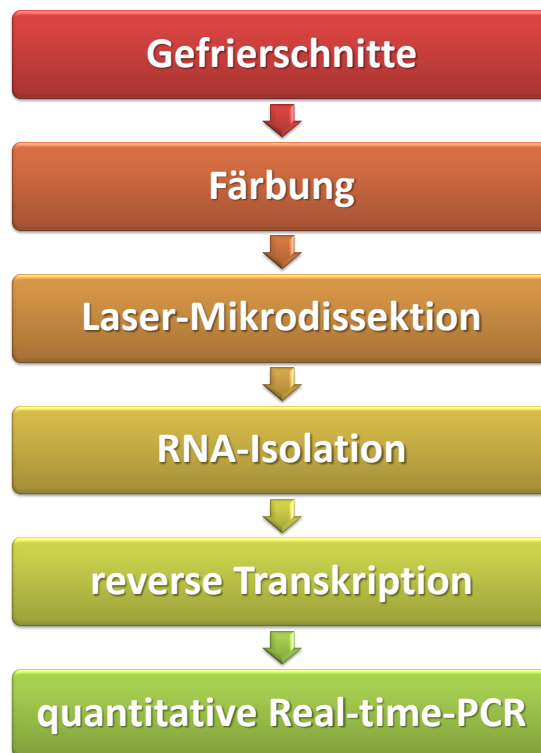


Abbildung 2.1.: Der Ablauf eines Versuchs mit Mikrodissektion von Gefrierschnitten und konsekutiver Genexpressionsanalyse (PCR: Polymerase-Kettenreaktion)

2.1.1. Reduktion von Ribonukleasen

Das Enzym Ribonuklease (RNase) ist ubiquitär, sehr stabil ([Burgemeister u. a., 2003](#)) und führt zu Degradation von RNA ([Saal u. a., 2003](#)). Bei der Nutzung von Lasermikrodissektion mit konsekutiver Genexpressionsanalyse spielt die Erhaltung von qualitativ hochwertiger RNA eine entscheidende Rolle, daher werden RNase-freie Bedingungen gefordert ([Mojsilovic-Petrovic u. a., 2004](#)).

Folgende Maßnahmen wurden eingehalten, um die Degradation des Probenmaterials zu minimieren:

1. regelmäßiges Wechseln von Handschuhen
2. Verwendung von zertifiziert RNase-freien Pipettenspitzen mit Filter (siehe Anhang C, Seite 97) und zertifiziert RNase-freien Reaktionsgefäßen (siehe Anhang C, Seite 97)
3. regelmäßige Reinigung von Arbeitsflächen und Instrumenten mit RNase-inhibierenden Substanzen („RNase AWAY“; siehe Anhang A, Seite 95)
4. Behandlung von Lösungen mit größerem Volumen (Milliliter- bis Liter-Bereich) mit DEPC (siehe Anhang A, Seite 94): Diethylpyrocarbonat inaktiviert RNasen in wässrigen Lösungen bei Anwendung in einer Konzentration von 0,1 % und anschließendem Autoklavieren ([Pernthaler u. Amann, 2004](#))
5. Behandlung von Lösungen mit geringem Volumen (Mikroliter-Bereich) oder Lösungen, die organische Bestandteile enthalten, durch Zugabe von RNase-Inhibitoren (siehe Anhang C, Seite 98)
6. Erhitzen von Glas (z. B. Färbeküvetten) für zwei Stunden bei 180 °C ([Grünwald, 2012](#))
7. Behandlung von Werkzeugen (z. B. Pinsel für die Arbeit im Kryostat; [Grünwald, 2012](#)) nach folgendem Schema:
 - Einlegen in eine 3 %-ige Wasserstoffperoxid-in-Wasser-Lösung (siehe Anhang A, Seite 95) für 10 Minuten
 - Einlegen in DEPC für 2 Stunden bei 37 °C
 - Spülen mit RNase-freiem Wasser
 - Autoklavieren für 15 Minuten
8. Bestrahlung von Kryostat (siehe Anhang G, Seite 103) und Polyethylenaphthalat-(PEN-)Membran-bespannten Objektträgern (siehe Anhang C, Seite 97) mit ultravioletter Licht (UV-C), jeweils über 45 Minuten ([Grünwald, 2012](#)).

2.1.2. Gefrierschnitte

Bei einer Kryostat-Temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden $8\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt und diese mittels Pinseln auf Objektträger transferiert. Direkt im Anschluss wurden die Schnitte zur Vermeidung einer Kontamination in möglichst kurzer Zeit eingefärbt beziehungsweise weiter behandelt (spezifische Protokolle unter Abschnitt 2.3.2, Seite 17, und 2.3.3, Seite 21, für MAP- beziehungsweise Abschnitt 2.4.1, Seite 28, für HBV-Versuche). Hiernach erfolgte die Dehydratation, da die auf die Objektträger aufgebrachte Membran nur in trockenem Zustand durch Laserenergie verdampft werden kann.

2.1.3. Selektion zu vergleichender Areale und Laser-Mikrodissektion

Die gewünschten Areale wurden lasermikrodisseziert und in getrennten Reaktionsgefäßen aufgefangen. In die Reaktionsgefäße wurde jeweils $50\text{ }\mu\text{l}$ proprietärer Lysepuffer aus dem RNA-Isolations-Kit (siehe Anhang D, Seite 99) vorgelegt, um das Risiko der Degradation des gewonnenen Materials zu minimieren. Die Dauer der Mikrodissektion wurde auf 20 bis 35 Minuten limitiert, um Qualitätsverluste zu minimieren. Nach deren Abschluss und Zugabe von weiteren $250\text{ }\mu\text{l}$ Lysepuffer wurden die Reaktionsgefäße mit den erhaltenen Dissektaten über 30 Sekunden im Reagenzglasschüttler (siehe Anhang G, Seite 104) bearbeitet und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.1.4. Isolation von RNA aus Mikrodissektaten

Für die Isolation von RNA wurde das „RNeasy Micro Plus Kit“ (siehe Anhang D, Seite 99) gemäß den Herstellervorgaben angewendet. Es handelt sich um ein säulenbasiertes Verfahren, das auf den Prinzipien Lyse und Nuklease-Inhibition durch Guanidiniumthiocyanat, sowie Nukleinsäure-Bindung an Siliziumdioxid basiert, wie von Boom u. a. (1990) beschrieben. Das Kit entfernt zusätzlich genomische DNA (Miranda u. a., 2010). Am Ende dieses Vorgangs lag die RNA pro Reaktionsgefäß aus Schritt 2.1.3 (Seite 11) in jeweils $12\text{ }\mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser vor.

2.1.5. Spektrophotometrische RNA-Analyse

Die isolierte RNA wurde hinsichtlich Qualität und Konzentration mittels „NanoDrop“-Spektrophotometer (siehe Anhang G, Seite 103) analysiert. Hierbei wurde die Absorption von UV-Licht durch die Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen - am Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren (Deben u. a., 2013) - und in Verhältnis zur Absorption bei 230 nm und 280 nm gesetzt. Es wurde jeweils $1\text{ }\mu\text{l}$ der RNA-Lösung auf die optische Einheit aufgetragen und die Konzentration, sowie die Quo-

tienten der Absorptionwerte bei 260 nm und 230 bzw. 280 nm ermittelt, wie von [Desjardins u. Conklin \(2010\)](#) beschrieben.

2.1.6. Reverse-Transkription geringer RNA-Mengen

Da mittels des angestrebten Verfahrens der Transkriptionsanalyse lediglich DNA amplifiziert werden kann ([Sellner u. a., 1992](#)), wurde mittels des Enzyms ‚reverse Transkriptase‘ aus der isolierten RNA einzelsträngige komplementäre DNA (complementary DNA; cDNA) synthetisiert. Zunächst lagern sich bei diesem Vorgang Desoxythymidin-Oligonukleotid-Primer (oligo-dT-Primer; siehe Anhang [C](#), Seite [97](#)) an die polyadenylierten mRNA-Enden (mRNA: messenger RNA/ Boten-RNA) an. Es folgt eine RNA-abhängige DNA-Polymerisation durch die reverse Transkriptase und schließlich der Abbau der mit der DNA hybridisierten mRNA, ebenfalls durch die reverse Transkriptase. Die resultierende cDNA entspricht der DNA-Sequenz, welche für die zu untersuchende mRNA-Sequenz kodiert ([Nam u. a., 2002](#)).

Da für die qRT-PCR größere Mengen cDNA benötigt werden bei einer relativ geringen Menge an mRNA, die bei der Lasermikrodissektion gewonnen werden kann ([Levesque-Sergerie u. a., 2007](#)), wurde ein für mRNA-Mengen kleiner 50 ng optimiertes Verfahren mit den zugehörigen Reagenzien gewählt (siehe Anhang [D](#), Seite [99](#)). Ein RNase-Inhibitor (auf 10 Einheiten/µl verdünnt; siehe Anhang [C](#), Seite [98](#)) wurde hinzugefügt, um einem Abbau der nicht gebundenen RNA entgegenzuwirken. Die Zusammensetzung der Reaktion kann Tabelle [2.1](#) (Seite [13](#)) entnommen werden. Sämtliche Reagenzien wurden als Reaktionsgemisch angesetzt, anschließend in einzelne Reaktionsgefäße verteilt und schließlich das RNA-Isolat hinzugefügt, so dass sich die angegebenen Volumina pro Reaktionsgefäß ergaben. Die Inkubation bei 37 °C für 60 Minuten und die folgende Abkühlung auf 4 °C erfolgte in einem entsprechend programmierten Thermocycler (siehe Anhang [G](#), Seite [104](#)).

2.1.7. Spektrophotometrische cDNA-Analyse

Die erhaltene cDNA wurde hinsichtlich Qualität und Konzentration mittels Spektrophotometer (siehe Abschnitt [2.1.5](#), Seite [11](#)) analysiert. Es wurde jeweils 1 µl der cDNA-Lösung auf die optische Einheit aufgetragen und die Konzentration, sowie die oben aufgeführten Quotienten bestimmt.

2.1.8. Quantitative Real-Time-PCR zur mRNA-Quantifizierung in mikrodisssezierten Proben

Zur sensitiven, spezifischen und reproduzierbaren mRNA-Quantifizierung ([Bustin, 2000](#)) in den mikrodisssezierten Proben wurde eine quantitative Real-Time-PCR mit dem Fluoreszenzfarbstoff „SYBR-Green“ und dem

Tabelle 2.1.: Zusammensetzung der Reverse-Transkriptase-Reaktion pro Reaktionsgefäß zur Umschreibung der aus der Mikrodissektion erhaltenen RNA in komplementäre DNA

proprietärer 10x-Puffer	2 µl
Ribonuklease-Inhibitor	1 µl
Ribonuklease-freies Wasser	2 µl
Desoxyribonukleotid-Triphosphate	2 µl
Desoxythymidin-Oligonukleotid-Primer	2 µl
„Sensiscript“ Reverse Transkriptase	1 µl
RNA-Isolat (siehe 2.1.4, Seite 11)	10 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 2.2.: Temperaturverlauf für quantitative Real-Time-PCR-Reaktionen mit „Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (2x)“: Nach Durchlaufen von Schritt 3 wurden die Schritte 2 und 3 40-mal wiederholt. Während Schritt 3 erfolgte die Messung der Fluoreszenz

Schritt	Vorgang	Temperatur (in °C)	Dauer (in Sekunden)
1	Denaturierung	95	600
2	Denaturierung	95	15
3	Primer-Bindung	60	60

Referenz-Farbstoff „ROX“ (siehe Anhang C, Seite 97) durchgeführt, wobei kleinste Konzentrationsunterschiede zwischen den Reaktionseinheiten durch Normalisierung der mit SYBR-Green erhaltenen Werte mit dem ROX-Signal ausgeglichen wurden (Bielas, 2005). Real-Time (Echtzeit) bedeutet hierbei, dass eine Fluoreszenz-Messung während jedem PCR-Zyklus durchgeführt wird (Bustin, 2000). Der Ablauf ist in Abbildung 2.2 (Seite 14) dargestellt.

Verwendet wurde ein Real-Time-PCR-Gerät (siehe Anhang G, Seite 104), dessen Lauf-Parameter mit der entsprechenden Software (siehe Anhang H, Seite 105) vor Reaktionsbeginn definiert wurde: Nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C über 10 min werden Denaturierung bei 95 °C über 15 s und Primer-Bindung bei 60 °C über 60 s mit anschließender Messung der Fluoreszenz vierzigmal wiederholt (siehe Tabelle 2.2, Seite 13).

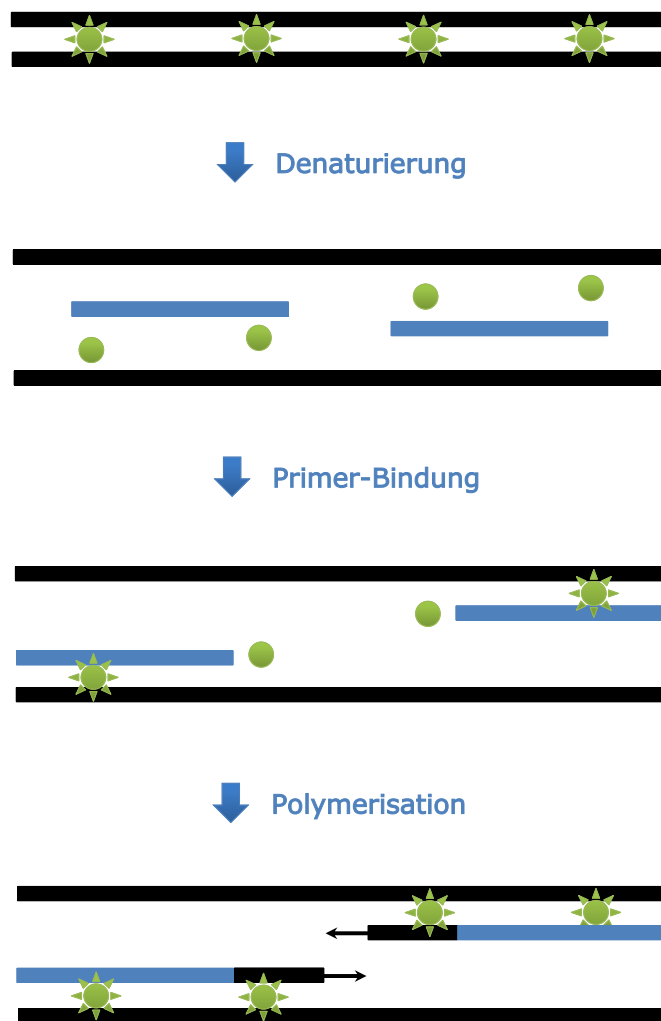


Abbildung 2.2.: schematischer Ablauf einer qRT-PCR mit SYBR-Green (nach [Bustin, 2000](#)): SYBR-Green-Moleküle (**grün**) binden an Doppelstrang-DNA. Nach der Denaturierung lässt sich lediglich ein hintergründiges Fluoreszenz-Signal detektieren. Das Signal wird nach Bindung der Primer (**blau**) stärker. Je weiter die Polymerisation voranschreitet, desto stärker wird das Signal. Der Vorgang wiederholt sich bis zum Erreichen der maximalen Zyklus-Zahl der PCR-Reaktion.

Der Reaktionsansatz bestand aus den in Tabelle [2.3](#) (Seite [15](#)) angegebenen Komponenten. Im „Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (2x)“ (siehe Anhang [C](#), Seite [97](#)) waren Taq-DNA-Polymerase, Puffer, Magnesiumchlorid (MgCl_2), Nukleosid-Triphosphate sowie SYBR-Green-Fluoreszenzfarbstoff enthalten.

Tabelle 2.3.: Reaktionsansatz für die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion mit „Platinum SYBR Green qPCR SuperMix“

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (2x)	10,0 µl
Ribonuklease-freies Wasser	3,6 µl
ROX-Referenzfarbstoff	0,4 µl
Sense-Primer	2,0 µl
Antisense-Primer	2,0 µl
Probe	2,0 µl
Gesamtvolumen	20 µl

2.1.9. Erstellung von Schmelzkurven zum Nachweis der Spezifität der Reaktion

Bei der Erstellung der Schmelzkurve eines bestimmten Amplikons wird die Fluoreszenz als Funktion der Temperatur dargestellt. Hierbei zeigt ein einzelner, charakteristischer Gipfel den Schmelzpunkt an. Nach Abschluss der qRT-PCR-Reaktion wurde die Temperatur der Reaktionsgefäße hierzu sukzessive um 0,1 °C gesteigert bis zum Erreichen einer Temperatur von 95 °C und währenddessen die Fluoreszenz detektiert (Bustin, 2000).

2.1.10. Interpretation von qRT-PCR-Ergebnissen mittels $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode

Die während jedes Zyklus aufgezeichneten Fluoreszenz-Werte stehen im Verhältnis zur Menge des amplifizierten Produkts. Zu einem bestimmten Zeitpunkt - der entsprechende Zyklus wird als C_T (threshold cycle: Zyklus der Überschreitung des Schwellenwerts) bezeichnet - übersteigt die Signalintensität das Hintergrundgeschehen. Von hier an verläuft die Amplifikation exponentiell. Je höher die Ausgangskonzentration eines Genprodukts, desto niedriger ist der C_T -Wert in der qRT-PCR (Bustin, 2000). Bei der relativen Genexpressionsanalyse wird die Expression eines Gens ins Verhältnis zu der eines Referenzgens gesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode zur Interpretation der Daten gewählt, wobei $2^{-\Delta\Delta C_T}$ der n-fachen Expression eines Gens in einer Probe im Vergleich zur Expression in einer anderen Probe entspricht, die zum selben Referenzgen in Bezug gesetzt wurde (Livak u. Schmittgen, 2001; Schmittgen u. Livak, 2008):

$$\Delta\Delta C_T = [(C_{T, Gen} - C_{T, Referenzgen})_{Probe A}] - [(C_{T, Gen} - C_{T, Referenzgen})_{Probe B}]$$

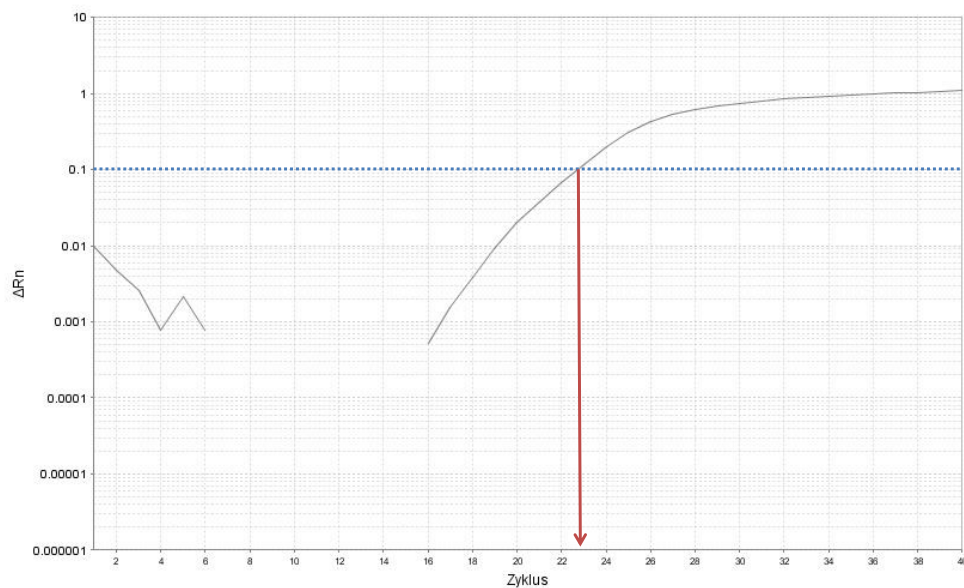


Abbildung 2.3.: Ermittlung des C_T -Werts: Dargestellt ist die Kurve der Amplifikation von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) während der quantitativen Real-Time-Polymerasekettenreaktion mit mikrodissiziertem Leberareal als Probe. Auf der Abszisse ist die Zyklenzahl abgetragen, auf der Ordinate der logarithmierte ΔRn -Wert, das grundlinienkorrigierte normalisierte Fluoreszenzsignal. Der C_T -Wert (threshold cycle; hier: 22,77) ist der Zyklus (**roter Pfeil**), an dem die Fluoreszenz den Schwellenwert (**gepunktete Linie**; hier: $\Delta Rn=0,1041$) überschreitet, ab dem die Amplifikation exponentiell verläuft.

2.2. Tierversuche

2.2.1. MAP-infizierte Ziegen

Proben aus dem Jejunum MAP-infizierter Ziegen wurden zur Verfügung gestellt vom Kooperationspartner Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Fachinstitut für molekulare Pathogenese in Jena, und sind unter der Nummer 04-002/08 beim Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz und Veterinärmedizin registriert.

2.2.2. LHBs-transgene Mäuse

Die Versuche mit LHBs-transgenen Mäusen entsprachen der „Anzeige eines Vorhabens nach dem Tierschutzgesetz“, genehmigt durch das Regierungspräsidium Gießen am 09.01.2012 mit dem Geschäftszeichen V 54 - 19 c 20 15 c GI 20/10 Nr. A 60/2011. Dem Umgang mit gentechnisch

veränderten Tieren wurde gentechnikrechtlich zugestimmt (Aktenzeichen IVMr46-53r30.03UGI62.12.01).

2.3. MAP-Infektion im Jejunum von Ziegen

2.3.1. Gesicherte MAP-Infektion bei Ziegen

Proben aus dem Jejunum MAP-infizierter Ziegen wurden am FLI nach Entnahme rasch eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Proben von vier Individuen wurden für die vorliegende Arbeit ausgewählt:

- Tier Nummer 09Zi0091, nachfolgend mit „ϕ“ gekennzeichnet, das in der veterinärpathologischen Untersuchung am FLI als multibazillär (hohe mykobakterielle Dichte; siehe [Clarke u. Little, 1996](#)) mit MAP infiziert und multifokale Veränderungen aufweisend beschrieben wurde
- Tier Nummer 10Zi0932, „χ“, multibazillär mit MAP infiziert und multifokale Veränderungen aufweisend
- Tier Nummer 10Zi0935, „ψ“, multibazillär mit MAP infiziert und diffuse Veränderungen aufweisend
- Tier Nummer 10Zi0936, „ω“, multibazillär mit MAP infiziert und diffuse Veränderungen aufweisend.

2.3.2. Molekularbiologische Methoden zum MAP-Nachweis in Mikrodissektaten

Immunhistochemische Färbung der Gefrierschnitte

Unmittelbar nach Anfertigung von Gefrierschnitten (siehe Abschnitt 2.1.2, Seite 11) aus den Jejunum-Proben wurden die Membran-bespannten Objektträger nach dem in Tabelle 2.4 (Seite 18) angegebenen Protokoll behandelt. Bei der IHC wird ein Antigen innerhalb eines Gewebeschnittes mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen ([Coons u. a., 1941](#); [Coons, 1949](#)). In diesem Fall wurde ein gegen das MAP1775-Epitop, das in der Membran von MAP gefunden wird ([Roderfeld u. a., 2012](#)), gerichteter Primärantikörper (siehe Anhang B, Seite 96) verwendet. Dieser wurde aus Kaninchenserum gewonnen, so dass ein mit dem fluoreszierenden Farbstoff Alexa 488 markierter Sekundärantikörper gegen das leporine Immunglobulin G (IgG; siehe Anhang B, Seite 96) eingesetzt wurde, um bei entsprechender Anregung durch Licht in einem Wellenlängenbereich um 488 nm ein grün fluoreszierendes Signal zu erhalten.

Die verwendete phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) mit einem pH-Wert von 7,4 bestand aus 0,8 g Natriumchlorid (NaCl), 0,2 g Kaliumchlorid (KCl), 0,245 g Kaliumdihydrogenphosphat

(KH_2PO_4), sowie 1,15 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) pro Liter destilliertem Wasser. Ihr wurde 500 μl pro Liter, entsprechend 0,05 %, Tween 20 (siehe Anhang A, Seite 95) als Detergenz zugesetzt. Die Pufferlösung ‚universal buffer solution‘ (UBS) bestand aus 5 % Rinderalbumin (bovine serum albumine, BSA), 0,1 % Gelatine aus Kaltwasserfisch, 0,1 % TritonX-100, sowie 0,05 % Tween 20 (siehe Anhang A, Seite 95). Die dehydratisierten Schnitte wurden anschließend fünf Minuten im Abzug luftgetrocknet und in das LMD-System eingelegt.

Tabelle 2.4.: Immunhistochemische Färbung mit MAP1775-Primärantikörper, Alexa-488-gekoppeltem-Immunglobulin-G-Sekundärantikörper und Dehydratation der jejunalen Gefrierschnitte für die anschließende Mikrodissektion mit konsekutiver DNA-Analyse (UBS: Universalpufferlösung; PBS: phosphatgepufferte Salzlösung)

Schritt	Dauer
Fixierung in Methanol:Aceton-1:1-Gemisch (-20 °C)	10 min
dreimaliges Waschen in PBS-Lösung	je 60 s
Blocken mit UBS	30 min
Inkubation mit MAP-Primärantikörper	30 min
dreimaliges Waschen in PBS-Lösung	je 60 s
Inkubation mit Sekundärantikörper	30 min
Waschen in PBS-Lösung	60 s
Dehydratation mit 70 % Ethanol	30 s
Dehydratation mit 96 % Ethanol	30 s
Dehydratation mit 100 % Ethanol	30 s
Dehydratation mit Xylol	30 s

Laser-Mikrodissektion

Wie oben beschrieben (siehe Abschnitt 2.1, Seite 9) wurden zahlreiche der zwei folgenden Areale zu insgesamt jeweils gleichen Flächenanteilen ausgeschnitten und in getrennten Reaktionsgefäßen aufgefangen:

- Gewebeabschnitte, die eine Fluoreszenz aufwiesen, entsprechend Fläche 1 in Abbildung 2.4 (Seite 19)
- Gewebeabschnitte, die keine Fluoreszenz aufwiesen und sich in unmittelbarer Umgebung der fluoreszierenden Areale befanden, entsprechend Fläche 2 in Abbildung 2.4 (Seite 19).

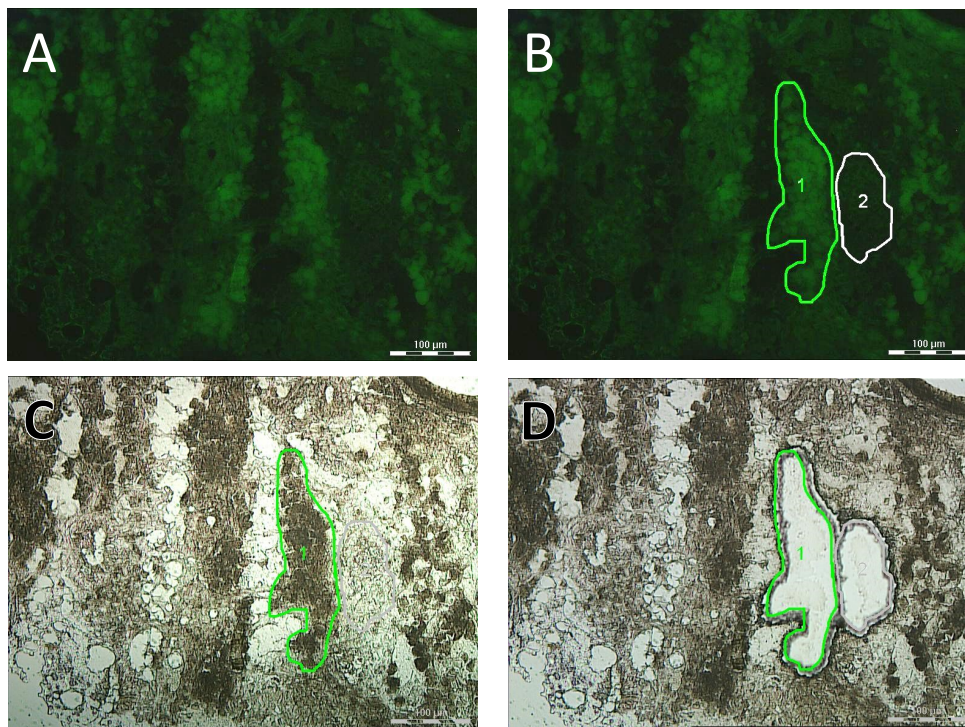


Abbildung 2.4.: Lasermikrodissektion MAP-positiver und -negativer Areale zur konsekutiven DNA-Extraktion: Fluoreszierende Areale nach Färbung und Dehydratation der Gefrierschnitte auf membranbespannten Objektträgern bei entsprechender Anregung (A) werden softwareunterstützt markiert (B) und anhand der Markierung (C) durch Laser-Energie aus dem Gewebsverband gelöst (D) und in getrennten Reaktionsgefäßen aufgefangen.

Molekularbiologischer MAP-Nachweis in mikrodissezierten Arealen

Für den Nachweis von MAP-DNA wurden jeweils Mikrodissektate aus fluoreszierenden Arealen und nicht-fluoreszierenden Arealen verglichen. Diese wurden mit dem entsprechenden Reaktionsansatz für die MAP-, MAA- bzw. MAH-spezifischen IS einer PCR zugeführt (siehe Tabelle 2.5, Seite 20 bzw. 2.6, Seite 21 bzw. 2.7, Seite 22). Folgende, die jeweilige IS zu beiden Seiten der Sequenz (Sense bzw. Antisense) flankierende Primerpaare, die gegebenenfalls an den entsprechenden Genabschnitt binden sollten, wurden verwendet (siehe Anhang E, Seite 100):

- IS-900 (Sense): 5'-gcgatgatcgacgcgtctttgg-3'
- IS-900 (Antisense): 5'-ttcttgaagggtggtcggggcc-3'
- IS-901 (Sense): 5'-gtctgggattggatgtcctg-3'

Tabelle 2.5.: Ansatz pro Reaktionsgefäß für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Insertionssequenz-(IS-)900-DNA in mikrodisezierten Jejunum-Proben

Reagenzien	Volumina
destilliertes Wasser	31,2 µl
10x PCR-Puffer	5,0 µl
Desoxyribonucleosidtriphosphat-Mix	1,0 µl
IS-900-Primer Sense	0,4 µl
IS-900-Primer Antisense	0,4 µl
50 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	1,5 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,5 µl
Probe	10,0 µl

- IS-901 (Antisense): 5'-caccacgtggtagcaatcc-3'
- IS-1245 (Sense): 5'-gccgccgaaacgatctac-3'
- IS-1245 (Antisense): 5'-aggtggcgtcgaggaaga-3'.

Die thermostabile Polymerase (Saiki u. a., 1988) „TopTaq DNA Polymerase“ (siehe Anhang C, Seite 98) sollte so bei vorhandener IS im Reaktionsgefäß die entsprechende Sequenz in 33 beziehungsweise 35 Zyklen Denaturierung, Hybridisierung (Primer-Bindung) und Elongation in exponentiellem Ausmaß amplifizieren (Mullis u. a., 1986). Es kamen der mit der Polymerase gelieferte Puffer und gegebenenfalls die proprietäre „Q-Solution“ zur Optimierung der PCR zur Anwendung. Als Bausteine für die Synthese von DNA-Strängen wurde ein Desoxyribonucleosidtriphosphat-Mix (dNTP-Mix; siehe Anhang C, Seite 97) verwendet. Als Negativkontrolle wurden Reaktionseinheiten mit destilliertem Wasser, sowie als Positivkontrolle solche mit genomischer DNA aus Kulturen der folgenden MAC-Referenzstämme mitgeführt:

- MAP: American Type Culture Collection (ATCC) BAA-968
- MAA: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) Nr. 44156 (entspricht ATCC 25291)
- MAH: Stamm 04A/1287 (FLI, Jena).

Die PCR lief unter den in Tabelle 2.8 (für IS-900 und IS-901; Seite 23) beziehungsweise 2.9 (für IS-1245; Seite 24) angegebenen Laufbedingungen in einem programmierbaren Thermocycler (siehe Anhang G, Seite 104) ab.

Tabelle 2.6.: Ansatz pro Reaktionsgefäß für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Insertionssequenz-(IS-)901-DNA in mikrodisszierten Jejunum-Proben

Reagenzien	Volumina
destilliertes Wasser	31,2 µl
10x PCR-Puffer	5,0 µl
Desoxyribonucleosidtriphosphat-Mix (10 mM)	1,0 µl
IS-901-Primer Sense	0,4 µl
IS-901-Primer Antisense	0,4 µl
50 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	1,5 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,5 µl
Probe	10,0 µl

Nach der PCR wurden zur Gel-Elektrophorese jeweils 2 µl aus jedem Reaktionsgefäß entnommen, mit jeweils 1 µl Ladepuffer (siehe Anhang C, Seite 97) vermischt und jeweils in einer separaten Bahn in 60 ml 1,5 %-Agarose-in-TAE-Gel (TAE: Tris-hydroxymethyl-aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure) mit 2 µl Ethidiumbromid (siehe Anhang A, Seite 94) eingebracht. Ein Größenmarker zur späteren Identifizierung der PCR-Produkte (siehe Anhang C, Seite 97) wurde hinzugefügt und die Elektrophorese über 40 min bei 65 V und 44 mA durchgeführt (siehe Anhang G, 103). Hierbei wurden die Nukleinsäuren in Richtung Anode bewegt, längere Fragmente langsamer als kurze (Takahashi u. a., 1969). Durch Interkalation von Ethidiumbromid in DNA (Aaij u. Borst, 1972) wurden die entstandenen Fraktionen unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht.

2.3.3. Messung der Zytokinexpression nach MAP-Infektion

Quantitativ untersucht wurde die jeweilige Expression von IL-10, IL-12 und IFN-γ in den vier Individuen im Vergleich zwischen mikroskopisch fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Arealen in Relation zum Referenzgen r18S (ribosomale RNA von 18 Svedberg) als Referenzgen.

Dehydratation der Gefrierschnitte

Zur Minimierung der Degradation des Probenmaterials wurde für die Gewinnung der mRNA aus mikrodisszierten Ziegen-Proben auf eine immunhistochemische Färbung verzichtet und stattdessen die beobachtete Autofluoreszenz (siehe Abschnitt 4.1.2, Seite 57) genutzt. Direkt nach Anfertigung der Gefrierschnitte (siehe Abschnitt 2.1.2, Seite 11) wurden

Tabelle 2.7.: Ansatz pro Reaktionsgefäß für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Insertionssequenz-(IS-)1245-DNA in mikrodisezierten Jejunum-Proben

Reagenzien	Volumina
destilliertes Wasser	12,3 µl
Q-Solution	4,0 µl
10x PCR-Puffer	2,0 µl
Desoxyribonucleosidtriphosphat-Mix (10 mM)	0,4 µl
IS-1245-Primer Sense	0,1 µl
IS-1245-Primer Antisense	0,1 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,1 µl
Probe	1,0 µl

diese zum Entfernen des Einbett-Mediums (siehe Anhang C, Seite 97) und zur Dehydratation nach dem in Tabelle 2.10 (Seite 24) angegebenen Protokoll behandelt, anschließend fünf Minuten im Abzug luftgetrocknet und im LMD-System aufgelegt.

Laser-Mikrodisektion

Wie oben beschrieben (siehe Abschnitt 2.1.3, Seite 11) wurden zahlreiche Mikrodisektate zu insgesamt jeweils gleichen Flächeninhalten aus den zwei folgenden Arealen in getrennten Reaktionsgefäßen aufgefangen:

- Gewebeabschnitte, die eine Fluoreszenz aufwiesen, entsprechend der Flächen 1 bis 3 in Abbildung 2.5 (Seite 25)
- Gewebeabschnitte, die keine Fluoreszenz aufwiesen und sich in unmittelbarer Umgebung der fluoreszierenden Areale befanden, entsprechend der Flächen 4 bis 7 in Abbildung 2.5 (Seite 25).

Quantitative Real-Time-PCR

RNA-Isolation (siehe Abschnitt 2.1.4, Seite 11), RNA-Analyse (siehe Abschnitt 2.1.5, Seite 11), reverse Transkription (siehe Abschnitt 2.1.6, Seite 12) und cDNA-Analyse (siehe Abschnitt 2.1.7, Seite 12) wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Für die folgende quantitative Real-Time-PCR-Reaktion wurde der in Tabelle 2.11, Seite 26, angegebene Reaktions-Ansatz verwendet. Die dort angegebenen Volumenangaben beziehen sich auf jeweils ein Reaktionsgefäß. Der „Fast SYBR Green Master Mix (2x)“ (siehe Anhang C, Seite 97) enthielt neben dem SYBR-

Tabelle 2.8.: Thermocycler-Programm für Polymerase-Kettenreaktion mit Insertionssequenz-(IS-)900 und -901: Nach Durchlaufen von Schritt 4 wurden die Schritte 2, 3 und 4 für IS-900 30-mal beziehungsweise für IS-901 35-mal wiederholt, bevor Schritt 5 ausgeführt wurde

Schritt	Vorgang	Temperatur (in °C)	Dauer (in Sekunden)
1	Denaturierung	98	30
2	Denaturierung	98	20
3	Primer-Bindung	58	30
4	Elongation	72	120
5	Elongation	72	600
6	Pause	4	

Green-Fluoreszenzfarbstoff und dem den Referenz-Farbstoff ROX eine Taq-DNA-Polymerase, Puffer und Nukleosid-Triphosphate. Verwendet wurden Primer für IL-10, IL-12, sowie IFN- γ (siehe Anhang E, Seite 100).

Der Temperaturverlauf der quantitativen Real-Time-PCR ist in Tabelle 2.12 (Seite 26) angegeben.

Eingesetzt wurden für jedes der vier Individuen 24 Reaktionsgefäße (siehe Anhang C, Seite 97) mit jeweils 20 μ l Reaktionsansatz, die mit den entsprechenden Verschlussstreifen (siehe Anhang C, Seite 97) verschlossen wurden. Es wurde jeweils für zwei Reaktionsgefäße der gleiche Ansatz mit dem gleichen Primer und der gleichen Probe verwendet, so dass sich jeweils Duplikate ergaben:

- jeweils 2 Reaktionsgefäße mit Primern für r18S, IL-10, IL-12 und IFN- γ und destilliertem Wasser als Negativkontrolle
- jeweils 2 Reaktionsgefäße mit Primern für r18S, IL-10, IL-12 und IFN- γ und cDNA aus mikroskopisch fluoreszierenden Arealen
- jeweils 2 Reaktionsgefäße mit Primern für r18S, IL-10, IL-12 und IFN- γ und cDNA aus nicht-fluoreszierenden Bereichen als Probe.

Die Interpretation der Ergebnisse aus der qRT-PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt (siehe Abschnitt 2.1.10, Seite 15).

2.3.4. Immunhistochemie zur Darstellung von MAP und CD8-positiven Zellen

Gefrierschnitte der Jejunum-Proben von allen vier Individuen wurden analog zu Abschnitt 2.3.2 (Seite 17) angefärbt, in Abwandlung des Protokolls 2.4 (Seite 18) wurden die Schnitte jedoch abschließend nicht dehy-

Tabelle 2.9.: Thermocycler-Programm für Polymerase-Kettenreaktion mit Insertionssequenz-1245: Nach Durchlaufen von Schritt 4 wurden die Schritte 2, 3 und 4 33-mal wiederholt, bevor Schritt 5 ausgeführt wurde

Schritt	Vorgang	Temperatur (in °C)	Dauer (in Sekunden)
1	Denaturierung	94	180
2	Denaturierung	94	60
3	Primer-Bindung	66	45
4	Elongation	72	240
5	Elongation	72	180
6	Pause	4	

Tabelle 2.10.: Dehydratation der Jejunum-Gefrierschnitte für die Laser-Mikrodissektion (DEPC: Diethylpyrocarbonat; PBS: phosphatgepufferte Salzlösung)

Vorgang	Dauer
dreimaliges Waschen in DEPC-behandelter PBS-Lösung	je 180 s
Dehydratation mit 70 % Ethanol	180 s
Dehydratation mit 96 % Ethanol	180 s
Dehydratation mit 100 % Ethanol	180 s
Dehydratation mit Xylol	180 s

dratisiert, sondern nach entsprechendem Waschen mit PBS unter Zuhilfenahme eines Eindeck-Mediums (siehe Anhang A, Seite 94) und Deckgläsern (siehe Anhang C, Seite 97) konserviert. Zur genaueren Lokalisation von MAP wurde bei Schnitten von Proben der Individuen φ und ψ zur Darstellung der Zellkerne DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol; siehe Anhang A, 94) verwendet, ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich der DNA anlagert und bei Anregung mit ultraviolettem Licht blau fluoresziert (Williamson u. Fennell, 1975; Kapuscinski, 1995).

Zusätzlich wurden Gefrierschnitte von Individuum ψ in 3 μm Schnittdicke angefertigt und nach dem Protokoll 2.13 (Seite 27) immunhistochemisch gefärbt. Zur Vermeidung von unspezifischer Anfärbung kam Pferdeserum zur Bindung von freien zellulären F_c -Rezeptoren (F_c : kristallisierbares Fragment/ fragment crystallisable) zum Einsatz (Bussolati u. Leonardo, 2008). Zusätzlich zu dem gegen MAP-gerichteten Primärantikörper mit dem entsprechenden Alexa-488-markierten Sekundärantikörper wurde in weiteren Färbeschritten ein aus Mäuseserum gewonnener

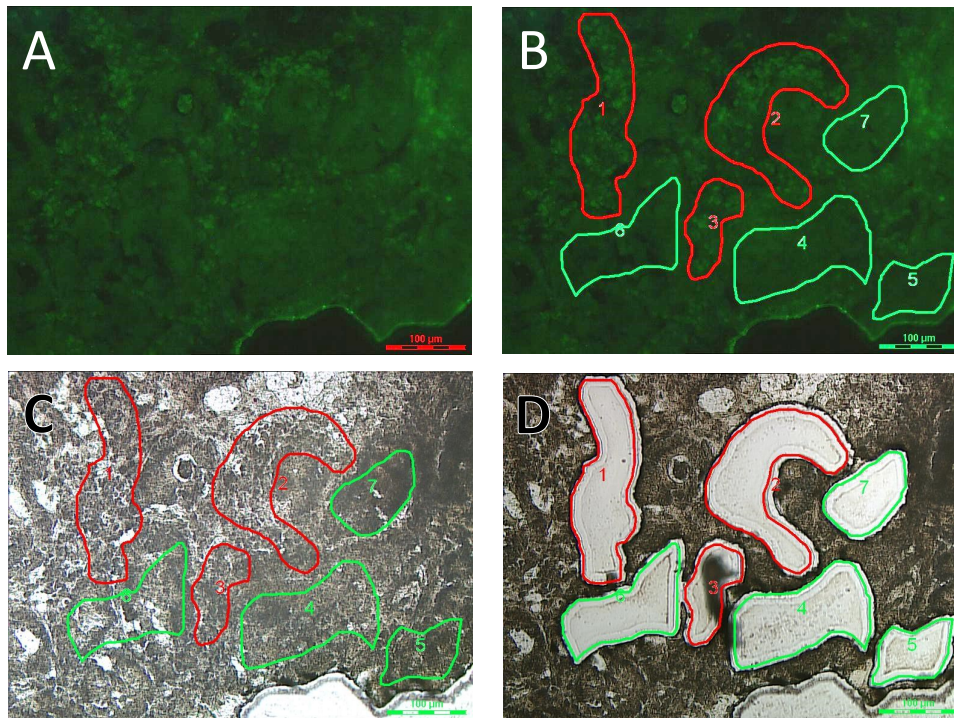


Abbildung 2.5.: Lasermikrodissektion fluoreszenz-positiver (**rot** umrandet) und -negativer Areale (**grün** umrandet) zur konsekutiven mRNA-Analyse: Fluoreszierende Areale nach Dehydratation der Gefrierschnitte auf membranbespannten Objektträgern bei entsprechender Anregung (**A**) werden markiert (**B**) und anhand der Markierung im lichtmikroskopischen Modus (**C**) durch Laserenergie aus dem Gewebsverband gelöst (**D**) und in getrennten Reaktionsgefäßen aufgefangen.

Antikörper gegen den Oberflächenmarker CD8 (siehe Anhang B, Seite 96) in Kombination mit einem Alexa-568-markierten Sekundärantikörper gegen murines IgG verwendet (siehe Anhang B, Seite 96), um MAP durch Anregung mit circa 495 nm als grün fluoreszierend darzustellen, CD8 mit circa 576 nm rot. Außerdem kam zur Kernfärbung DAPI zur Anwendung. Nach entsprechendem Waschen mit PBS wurden die Schnitte eingedeckt. Die in der Arbeit verwendeten Abbildungen entsprechen Digital-Photographien (siehe Anhang G, Seite 103), die während der Fluoreszenz-Mikroskopie (siehe Anhang G, Seite 103) aufgenommen wurden und mittels Bildbearbeitungssoftware (siehe Anhang H, Seite 105) nach Optimierung von Kontrast und Helligkeit zur besseren Darstellung übereinander projiziert wurden.

Tabelle 2.11.: Reaktionsansatz für quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion mit mikrodisszierten Jejunum-Arealen

Reagenzien	Volumina
Fast SYBR Green Master Mix (2x)	10 µl
Ribonuklease-freies Wasser	7,90 µl
Sense-Primer	0,05 µl
Antisense-Primer	0,05 µl
Probe	2 µl

Tabelle 2.12.: Temperaturverlauf für quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktionen mit mikrodisszierten Jejunum-Arealen und „Fast SYBR Green Master Mix“: Nach Durchlaufen von Schritt 3 wurden die Schritte 2 und 3 40-mal wiederholt. Während Schritt 3 erfolgte die Messung der Fluoreszenz

Schritt	Vorgang	Temperatur (in °C)	Dauer (in Sekunden)
1	Denaturierung	95	20
2	Denaturierung	95	3
3	Primer-Bindung	60	30

Tabelle 2.13.: Immunhistochemie von jejunalen Gefrierschnitten zur MAP- und CD8-Darstellung (PBS: phosphatgepufferte Salzlösung; UBS: Universalpufferlösung; CD8: Cluster of Differentiation 8; DAPI: 4,6-Diamidin-2-phenylindol)

Schritt	Dauer
Fixierung in -20 °C kaltem Methanol:Aceton-1:1-Gemisch	2 min
dreimaliges Waschen in PBS-Lösung	je 3 min
Blocken mit UBS	30 min
dreimaliges Waschen in PBS-Lösung	je 3 min
F _c -Block mit 5% Pferdeserum in PBS	30 min
dreimaliges Waschen in PBS-Lösung	je 3 min
Inkubation mit MAP-Primärantikörper (1:1.000 verdünnt)	10 h
dreimaliges Waschen in PBS-Lösung	je 3 min
Inkubation mit Sekundärantikörper (anti leporines IgG; Alexa-488-gekoppelt; 1:1.000 verdünnt)	20 min
dreimaliges Waschen in PBS-Lösung	je 3 min
Inkubation mit CD-8-Primärantikörper (1:1.000 verdünnt)	60 min
dreimaliges Waschen in PBS-Lösung	je 3 min
Inkubation mit Sekundärantikörper (anti murines IgG; Alexa-568-gekoppelt; 1:1.000 verdünnt)	20 min
Inkubation mit DAPI (1:10.000 verdünnt)	5 min
dreimaliges Waschen in PBS-Lösung	je 3 min
Eindecken mit Eindeck-Medium und Deckgläsern	

2.4. LHBs-Produktion in der Leber transgener Mäuse

2.4.1. LHBs-Akkumulation

Es wurden Leber-Anteile einer sieben Wochen alten LHBs-transgenen Maus verwendet. Das Tier stammte aus einer Linie von BALB/cJ-Mäusen, die transgen für das große Oberflächenprotein des HBV sind (BALB/cJ-LHBV). Sie wurden über zehn Generationen von C57BL/6J-Tg(Alb-1HBV)44Bri/J auf BALB/cJ zurück gekreuzt. Ein Albumin-Promotor sorgt für eine gezielte Expression des Transgens in der Leber der Tiere (Pinkert u. a., 1987). Die von Chisari u. a. (1985) entwickelten HBV-transgenen Mäuse, insbesondere die für die vorliegende Arbeit verwendeten Abkömmlinge der besonders stark exprimierenden Linie 50-4 (Chisari u. a., 1987), dienen als Modell für die Leber-spezifische Expression von HBV-Proteinen, die letztendlich zur Tumorentstehung führt (Crawford u. a., 2006). Ihre Hepatozyten produzieren das LHBs im Zytoplasma ohne es zu sezernieren, welches daher im ER akkumuliert. Hierdurch kommt es im Alter von drei Monaten zur Dysplasie. In einem Alter von sechs Monaten folgt eine Regeneration des Gewebes durch Hyperplasie und schließlich die Entwicklung eines HCC mit 15 bis 18 Monaten (siehe Chisari u. a., 1989 und Crawford u. a., 2006, sowie Abbildung 2.6 auf Seite 29).

Die Tötung des Tieres erfolgte durch Induktion eines Atem- und Kreislaufstillstandes durch Einbringen in ein mit Isofluran-Gas befülltes, abgedichtetes Gefäß. Nach Eintritt des Todes wurde der Bauchraum eröffnet, die Leber freipräpariert und in Fragmente von circa 1 cm³ zerteilt. Anschließend wurden diese in mit Glycol- und Harz-haltigem Gel (siehe Anhang C, Seite 98) gefüllte Kunststoffformen (siehe Anhang C, Seite 97) eingebettet und auf Trockeneis innerhalb einer Minute eingefroren, um schließlich bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert zu werden.

Herstellung der Gefrierschnitte und Hämatoxylin-Färbung

Aus dem Leber-Präparat wurden Gefrierschnitte angefertigt (siehe Abschnitt 2.1.2, Seite 11) und direkt im Anschluss wie in Tabelle 2.14 (Seite 30) angegeben gefärbt und dehydratisiert. Die eingesetzte Hämatoxylin-Lösung bestand hierbei aus zwei Teilen Hämatoxylin nach Meyer (siehe Anhang A, Seite 94) und drei Teilen destilliertem Wasser. Das verwendete Wasser wurde zuvor mit DEPC behandelt (siehe Punkt 7, Seite 10), sämtliche Lösungen auf Eis gekühlt. Die gefärbten und dehydratisierten Schnitte wurden aus der mit 100 % Ethanol gefüllten Küvette entnommen, fünf Minuten luftgetrocknet und in das LMD-System eingesetzt.

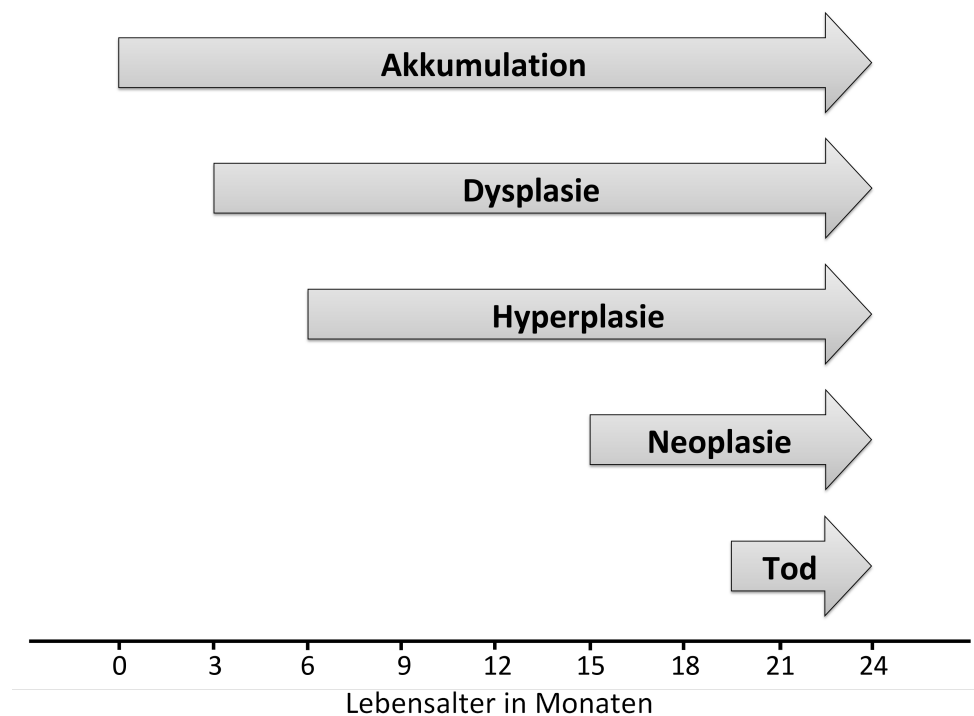


Abbildung 2.6.: Verlauf der Lebererkrankung bei transgenen Mäusen anhand des Lebensalters in Monaten (nach [Chisari u. a., 1989](#)): Das ungefähre zeitliche Auftreten einer Veränderung ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet.

2.4.2. Laser-Mikrodissektion zur Lokalisierung von ER-Stress

Laser-Mikrodissektion

Zur Lokalisierung von ER-Stress-Parametern wurden (nach Herstellung und Färbung von Gefrierschnitten wie in Abschnitt 2.4.1, Seite 28 angegeben) mehrere flächengleiche Areale der zwei folgenden Strukturen mikrodisseziert und in getrennten Reaktionsgefäßen aufgefangen:

- ein Portalfeld umgebende Zellen (periportal), siehe Abbildung 2.7, Seite 31
- eine Zentralvene umgebende Zellen (perizentral/ zentrilobulär), siehe Abbildung 2.8, Seite 32.

quantitative Real-Time-PCR

RNA-Isolation (siehe Abschnitt 2.1.4, Seite 11), RNA-Analyse (siehe Abschnitt 2.1.5, Seite 11), reverse Transkription (siehe Abschnitt 2.1.6, Seite 12) und cDNA-Analyse (siehe Abschnitt 2.1.7, Seite 12) wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Bei der anschließenden quantitativen Real-Time-PCR-Reaktion kam der Reaktions-Ansatz mit den in Ta-

Tabelle 2.14.: Kurze Hämatoxylin-Färbung und Dehydratation von mikrodisszierten Leber-Proben (modifiziert nach Grünwald, 2012)

Schritt	Dauer
destilliertes Wasser	20 Sekunden
Hämatoxylin-Lösung (Hämatoxylin:Wasser = 2:3)	20 Sekunden
destilliertes Wasser	5 Sekunden
70 % Ethanol	5 Sekunden
96 % Ethanol	5 Sekunden
100 % Ethanol	5 Minuten

belle 2.3 (Seite 15) angegebenen Komponenten zum Einsatz. Verwendet wurden Primer für ATF-3, DDIT-3 und das Referenzgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; siehe Anhang E, Seite 100). Der Temperaturverlauf ist in Tabelle 2.2 (Seite 13) angegeben.

Eingesetzt in die Reaktion wurden insgesamt 27 Reaktionsgefäße (siehe Anhang C, Seite 97) mit jeweils 20 µl Reaktionsansatz, die mit den entsprechenden Deckeln (siehe Anhang C, Seite 97) verschlossen wurden. Es wurde jeweils für drei Reaktionsgefäße der gleiche Ansatz mit dem gleichen Primer und der gleichen Probe verwendet, so dass sich jeweils Triplikate ergaben:

- jeweils drei Reaktionsgefäße mit Primern für GAPDH, ATF-3 und DDIT-3 und Wasser als Negativkontrolle
- jeweils drei Reaktionsgefäße mit Primern für GAPDH, ATF-3 und DDIT-3 und cDNA aus periportalten Bereichen als Probe
- jeweils drei Reaktionsgefäße mit Primern für GAPDH, ATF-3 und DDIT-3 und cDNA aus perizentralen Arealen als Probe.

Die Interpretation der Ergebnisse aus der qRT-PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt (siehe Abschnitt 2.1.10, Seite 15).

2.4.3. Laser-Mikrodissektion von konzentrischen Zonen um die Vena centralis

Färbung und Dehydratation der Gefrierschnitte

Über drei Durchläufe wurden die Gefrierschnitte (siehe Abschnitt 2.4.1, Seite 28) wie in Tabelle 2.14 (Seite 30) dargestellt gefärbt, dehydratisiert und behandelt wie oben beschrieben (siehe Abschnitt 2.4.1, Seite 28).

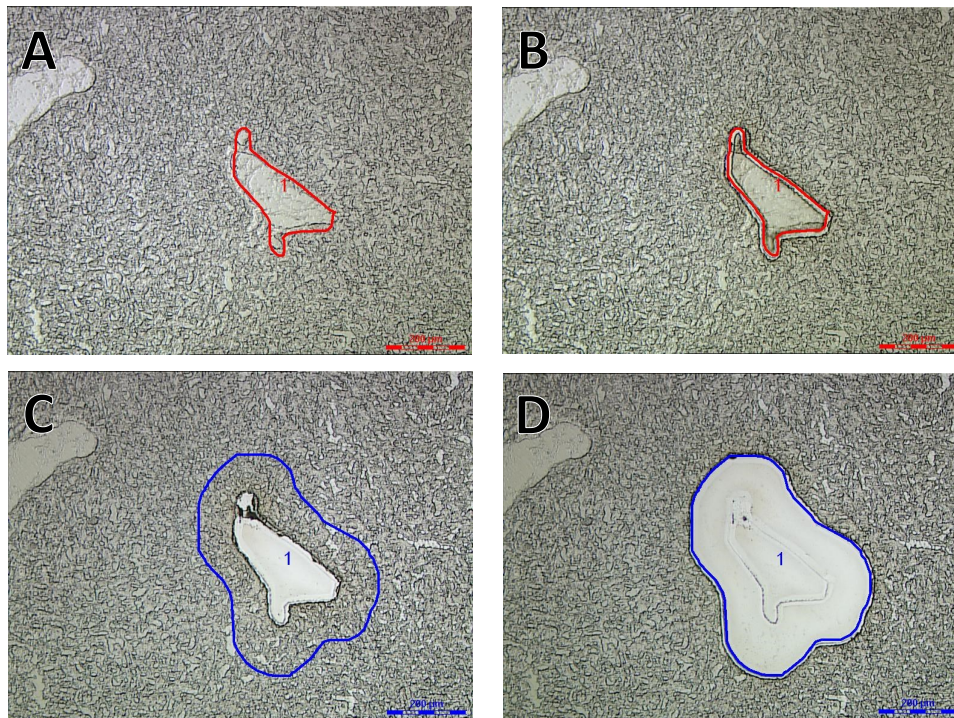


Abbildung 2.7.: Lasermikrodissektion eines periportal Areal innerhalb eines Hämatoxylin-gefärbten Leber-Gefrierschnitts zur konsekutiven mRNA-Analyse: Nach Mikrodissektion entlang einer Markierung (**A**) um die Gefäßlumina und Verwerfen des entstandenen Mikrodisektats (**B**) wurde ein periportales Areal markiert (**C**) und mittels Laserenergie aus dem Gewebsverband gelöst (**D**). Das Ausschneiden der Lumina diente dem Ausschluss von Endothelzellen und eventuell verbliebenem Gefäßinhalt, sowie der Bestimmung der Fläche des endgültigen Dissektats (**blau** markiert) durch Subtraktion der **rot** umrandeten Fläche.

Laser-Mikrodissektion

Es wurden jeweils vier Zonen (von perizentral nach peripher: α , β , γ , δ) mit jeweils etwa $30.000 \mu\text{m}^2$ zentrifugal um Zentralvenen ausgeschnitten (siehe Abbildung 2.9, Seite 33) und in getrennten Reaktionsgefäßen aufgefangen.

Quantitative Real-Time-PCR

RNA-Isolation (siehe Abschnitt 2.1.4, Seite 11), RNA-Analyse (siehe Abschnitt 2.1.5, Seite 11), reverse Transkription (siehe Abschnitt 2.1.6, Seite 12) und cDNA-Analyse (siehe Abschnitt 2.1.7, Seite 12) wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Der Reaktions-Ansatz für die quantita-

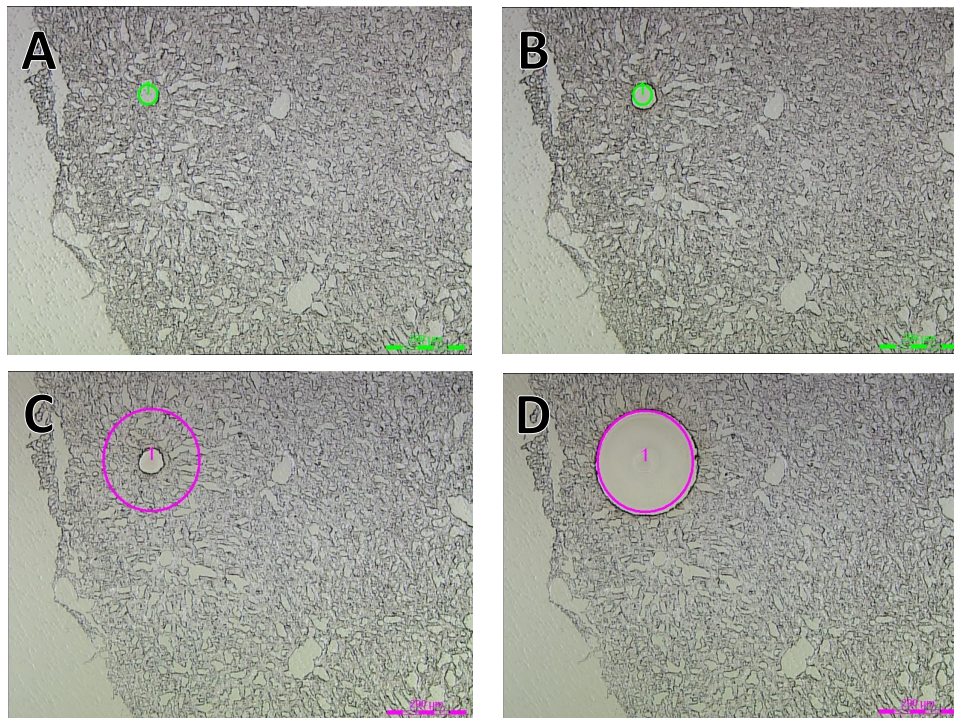


Abbildung 2.8.: Lasermikrodissektion eines perizentralen Areals innerhalb eines Hämatoxylin-gefärbten Leber-Gefrierschnitts zur konsekutiven mRNA-Analyse (analog zu Abbildung 2.7 auf Seite 31): Ausschneiden des Lumens mit Gefäßwand (**hellgrün** markiert; **A** und **B**) und eines Areals um die Zentralvene (**violett** markiert; **C** und **D**).

tive Real-Time-PCR kann Tabelle 2.3 (Seite 15) entnommen werden. Es wurden Primer für ATF-3 und DDIT-3 (siehe Anhang E, Seite 100) verwendet, sowie für GAPDH als Referenzgen. Der Temperaturverlauf ist in Tabelle 2.2 (Seite 13) angegeben. Eingesetzt in die Reaktion wurden 126 Reaktionsgefäße mit jeweils 20 µl Reaktionsansatz. Es wurde jeweils für zwei (Negativkontrolle) beziehungsweise drei Reaktionsgefäße der gleiche Ansatz mit dem gleichen Primer und der gleichen Probe verwendet, so dass sich jeweils Duplikate beziehungsweise Triplikate ergaben: jeweils zwei Reaktionsgefäße mit Primern für GAPDH, ATF-3 und DDIT-3 und Wasser als Negativkontrolle jeweils über drei Durchläufe, sowie jeweils drei Reaktionsgefäße mit Primern für GAPDH, ATF-3 und DDIT-3 und cDNA aus jeder Zone über drei Durchläufe.

Die Interpretation der quantitativen Real-Time-PCR-Ergebnisse (siehe Abschnitt 2.1.10, Seite 15) und der Schmelzkurven-Reaktion (siehe Abschnitt 2.1.9, Seite 15) wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

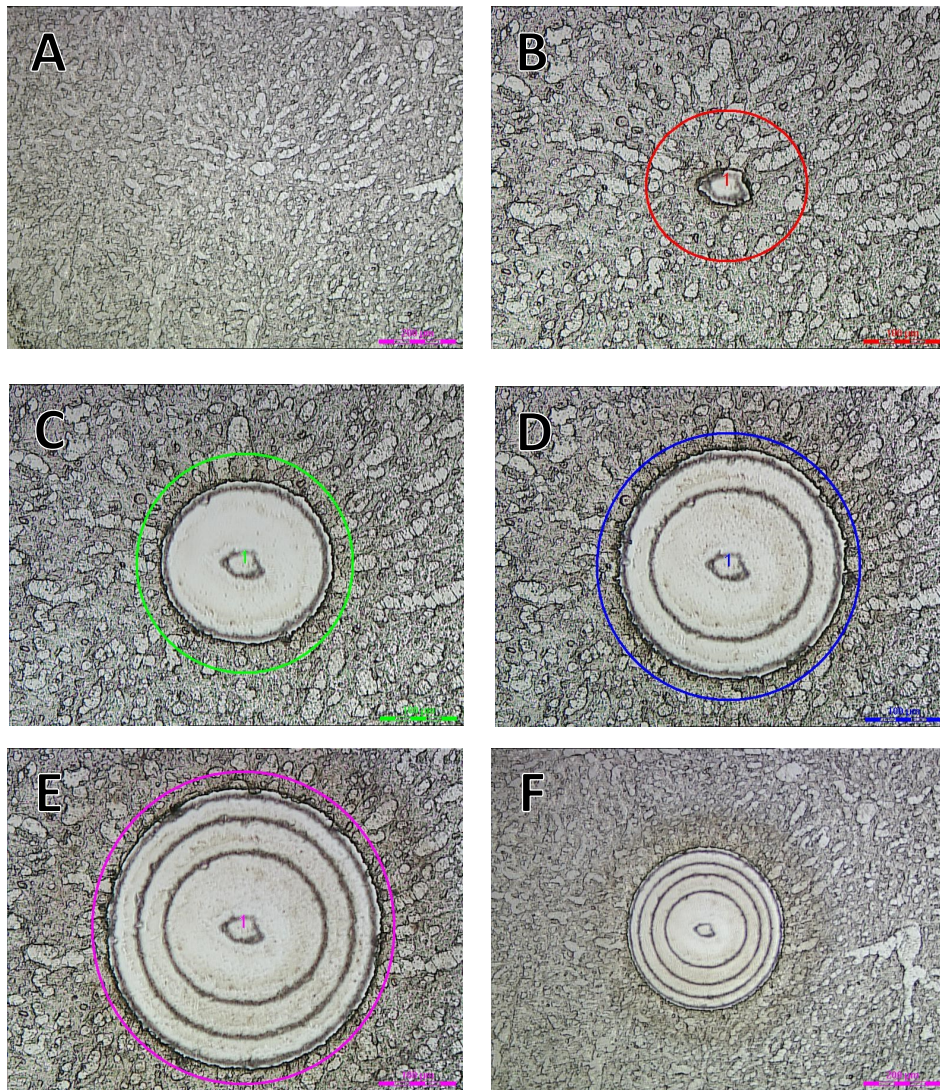


Abbildung 2.9.: Lasermikrodissektion konzentrischer Areale um V. centralis-Äste in Hämatoxylin-gefärbten Leber-Gefrierschnitten zur konsekutiven mRNA-Analyse: Nach Identifikation der Zentralvene (**A**), Ausschneiden und Verwerfen des Lumens mit Gefäßwand (**B**), erfolgte die Mikrodissektion von vier konzentrischen, flächengleichen perivaskulären Arealen: Zone α , rot markiert in **B**; Zone β , grün in **C**; Zone γ , blau in **D**; Zone δ , rosa in **E**.

2.4.4. Immunhistochemische Visualisierung von ER-Stress-Parametern

Gefrierschnitte der Leber-Proben von 3 μm Schnittdicke, die unmittelbar nach Herstellung der Schnitte für die LMD angefertigt wurden, wurden nach dem in Tabelle 2.15 (Seite 34) dargestellten Protokoll immunhistochemisch gefärbt. Die Schnitte wurden in Aceton-Methanol-Gemisch

fixiert und die endogene Peroxidase neutralisiert mit 0,3 % Wasserstoffperoxid (siehe Anhang A, Seite 95) und 0,3 % Pferdeserum (siehe Anhang A, Seite 95) in PBS. Ein an Peroxidase gebundener und gegen leporines IgG gerichteter Sekundärantikörper (siehe Anhang A, Seite 95) und Peroxidase-Substrat (siehe Anhang A, Seite 95), das ein blass-violettes Reaktionsprodukt ergibt (Lanciego u. a., 1997), wurden nach Herstellervorgaben eingesetzt. Nach Stoppen der Peroxidase-Reaktion in Wasser wurden die gefärbten Schnitte mit Eindeckmedium (siehe Anhang A, Seite 95) und Deckgläsern konserviert.

Tabelle 2.15.: Immunhistochemie von Leber-Gefrierschnitten zur ATF-3-beziehungsweise DDIT-3-Darstellung (ATF-3: Activating transcription factor 3; DDIT-3: DNA-damage-inducible transcript-3; PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung)

Schritt	Dauer
Lufttrocknen	30 min
Fixierung in -20 °C kaltem Mehtanol:Aceton-1:1-Gemisch	30 s
dreimaliges Waschen in PBS	je 3 min
Neutralisierung der endogenen Peroxidase	5 min
dreimaliges Waschen in PBS	je 3 min
Inkubation mit Primärantikörper (ATF-3 bzw. DDIT-3)	30 min
dreimaliges Waschen in PBS	je 3 min
Inkubation mit Sekundärantikörper (anti leporines IgG; peroxidase-gekoppelt)	30 min
dreimaliges Waschen in PBS	je 3 min
Inkubation mit Peroxidase-Substrat	4 min
Waschen in Leitungswasser	5 min
Dehydration mit Ethanol 70 %	5 s
Dehydration mit Ethanol 96 %	5 s
Dehydration mit Ethanol 100 %	5 s
Dehydration mit Xylol	5 s
Eindecken mit Eindeckmedium und Deckgläsern	

Kapitel 3.

Ergebnisse

3.1. MAP-Infektion im Jejunum von Ziegen

3.1.1. Molekularbiologischer Nachweis von MAP-DNA

Für die Probe aus den mit MAP-spezifischem Antikörper gefärbten Arealen nach PCR mit IS-900-Primern zeigte sich in dem mit ultraviolettem Licht angeregten Gel nach Elektrophorese eine Bande bei circa 600 Basenpaaren Molekülgröße. Auf gleicher Höhe erschien eine Bande in der Bahn mit der Positivkontrolle aus der Kultur BAA-968. Im Elektrophorese-Resultat der Reaktion mit IS-901-Primern ließen sich lediglich für die Positivkontrolle aus der Kultur DSMZ Nr. 44156 eine Bande erkennen. In den Reaktionen mit IS-1245-Primern waren die Bahnen mit der Kultur-DNA aus DSMZ Nr. 44156 und Stamm 04A/1287 mit einem darstellbaren PCR-Produkt versehen. In den Bahnen sämtlicher Negativkontrollen zeigten sich keine Banden (siehe Abbildung 3.1 auf Seite 39; vergleiche Tabelle 3.1 auf Seite 40).

3.1.2. Quantifizierung der Zytokinexpression in betroffenen Arealen

Laser-Mikrodissektion

Mikrodisseziert wurden

- aus der Probe von Individuum 09Zi0091φ: 532.984 μm^2 aus mikroskopisch fluoreszierenden und 515.884 μm^2 aus nicht-fluoreszierenden Arealen (Unterschied zwischen den Flächeninhalten: 3,31%)
- aus der Probe von Individuum 09Zi0932χ: 377.963 μm^2 aus mikroskopisch fluoreszierenden und 370.007 μm^2 aus nicht-fluoreszierenden Arealen (Unterschied: 2,15%)
- aus der Probe von Individuum 09Zi0935ψ: 606.073 μm^2 aus mikroskopisch fluoreszierenden und 587.649 μm^2 aus nicht-fluoreszierenden Arealen (Unterschied: 3,14%)
- aus der Probe von Individuum 09Zi0936ω: 507.110 μm^2 aus mikroskopisch fluoreszierenden und 531.219 μm^2 aus nicht-fluoreszierenden Arealen (Unterschied: 4,54%).

Die maximale Dauer der Laser-Mikrodissektion, vom Zeitpunkt des Einlegens der Schnitte in das LMD-System bis zur Entnahme der Reaktionsgefäße mit den Mikrodissektaten, betrug circa 30 Minuten.

RNA-Analyse

Exemplarisch wurde die RNA-Konzentration der Mikrodissektate aus der Probe von Individuum 09Zi0935 ψ bestimmt mit 2,16 ng/ μ l aus mikroskopisch fluoreszierenden Arealen beziehungsweise 3,78 ng/ μ l aus nicht-fluoreszierenden Arealen. Der 260/280-Quotienten war 1,83 beziehungsweise 1,64. Bei der spektrophotometrischen RNA-Analyse sprechen hohe 260/280-Werte (siehe Abschnitt 2.1.5, Seite 11) für das Fehlen von Kontamination, idealerweise liegt der Quotient nahe 2,0 (Pinto u. a., 2009).

cDNA-Analyse

Aus der isolierten RNA wurde cDNA hergestellt:

- aus Mikrodissektaten von Individuum 09Zi0091 ϕ mit einer Konzentration von 1018,57 ng/ μ l (260/280-Quotient: 1,81) aus fluoreszierenden und 1030,61 ng/ μ l (260/280-Quotient: 1,85) aus nicht-fluoreszierenden Arealen (Konzentrationsunterschied: 1,17%)
- aus Mikrodissektaten von Individuum 09Zi0932 χ mit einer Konzentration von 527,98 ng/ μ l (260/280-Quotient: 1,73) aus fluoreszierenden und 793,45 ng/ μ l (260/280-Quotient: 1,83) aus nicht-fluoreszierenden Arealen (Unterschied: 33,46%)
- aus Mikrodissektaten von Individuum 09Zi0935 ψ mit einer Konzentration von 807,18 ng/ μ l (260/280-Quotient: 1,81) aus fluoreszierenden und 778,16 ng/ μ l (260/280-Quotient: 1,84) aus nicht-fluoreszierenden Arealen (Unterschied: 3,60%)
- aus Mikrodissektaten von Individuum 09Zi0936 ω mit einer Konzentration von 830,67 ng/ μ l (260/280-Quotient: 1,84) aus fluoreszierenden und 834,67 ng/ μ l (260/280-Quotient: 1,86) aus nicht-fluoreszierenden Arealen (Unterschied: 0,48%)

Abbildung 3.2 auf Seite 40 zeigt exemplarisch die Absorptionskurve der spektrophotometrischen Messung einer cDNA-Probe aus einem lasermikrodisseziertem Jejunum-Gefrierschnitt. Neben dem 260/280-Quotient wurde als sekundärer Parameter das Verhältnis 260/230 herangezogen, hierbei sprechen Werte zwischen 1,8 und 2,2 für Reinheit (Desjardins u. Conklin, 2010).

quantitative Real-Time-PCR

Über Duplikate, Reaktionsgefäße mit gleichem Reaktionsansatz, wurde aus den C_T -Werten der einzelnen Reaktionseinheiten mit cDNA aus mikrodisszezierten Jejunum-Arealen von vier verschiedenen Individuen das arithmetische Mittel bestimmt. Die jeweiligen durchschnittlichen C_T -Werte sind in Tabelle 3.2 auf Seite 41 aufgelistet.

Es wurde die n-fache Expression der Zielgene IL-10, IL-12 und IFN- γ in mikroskopisch fluoreszierenden Arealen im Vergleich zu nicht fluoreszierenden Bereichen ermittelt, indem diese jeweils zum Referenzgen r18S in Bezug gesetzt wurde:

IL-10:

$$\begin{aligned} 2^{-\Delta\Delta C_T} &= \\ &= 2^{-[(C_{T, IL-10} - C_{T, r18S})_{\text{fluoreszierend}}] - [(C_{T, IL-10} - C_{T, r18S})_{\text{nichtfluoreszierend}}]} \end{aligned}$$

IL-12:

$$\begin{aligned} 2^{-\Delta\Delta C_T} &= \\ &= 2^{-[(C_{T, IL-12} - C_{T, r18S})_{\text{fluoreszierend}}] - [(C_{T, IL-12} - C_{T, r18S})_{\text{nichtfluoreszierend}}]} \end{aligned}$$

IFN- γ :

$$\begin{aligned} 2^{-\Delta\Delta C_T} &= \\ &= 2^{-[(C_{T, IFN\gamma} - C_{T, r18S})_{\text{fluoreszierend}}] - [(C_{T, IFN\gamma} - C_{T, r18S})_{\text{nichtfluoreszierend}}]} \end{aligned}$$

Somit ergab sich für die Individuen (siehe Abbildung 3.3 auf Seite 42)

- 09Zi0091 ϕ für IL-10 eine 1,20-, für IL-12 eine 1,99- und für IFN- γ eine 1,70-fache Expression in den mikroskopisch fluoreszierenden im Vergleich zu den nicht-fluoreszierenden Bereichen:
 $2^{-[(25,484-25,937)-(25,433-25,627)]} = 1,20$ beziehungsweise
 $2^{-[(30,605-25,937)-(31,285-25,627)]} = 1,99$ beziehungsweise
 $2^{-[(27,831-25,937)-(28,284-25,627)]} = 1,70$
- 10Zi0932 χ für IL-10 eine 2,51-, für IL-12 eine 1,98- und für IFN- γ eine 2,04-fache Expression in den mikroskopisch fluoreszierenden im Vergleich zu den nicht-fluoreszierenden Bereichen:
 $2^{-[(24,558-24,400)-(25,454-23,966)]} = 2,51$ beziehungsweise
 $2^{-[(28,282-24,400)-(28,833-23,966)]} = 1,98$ beziehungsweise
 $2^{-[(25,699-24,400)-(26,291-23,966)]} = 2,04$
- 10Zi0935 ψ für IL-10 eine 2,14-, für IL-12 eine 1,70- und für IFN- γ eine 3,52-fache Expression in den mikroskopisch fluoreszierenden im Vergleich zu den nicht-fluoreszierenden Bereichen:
 $2^{-[(28,262-23,909)-(28,788-23,334)]} = 2,14$ beziehungsweise
 $2^{-[(31,347-23,909)-(31,536-23,334)]} = 1,70$ beziehungsweise
 $2^{-[(27,169-23,909)-(28,410-23,334)]} = 3,52$

- 10Zi0936 ω für IL-10 eine 0,98-, für IL-12 eine 1,72- und für IFN- γ eine 2,01-fache Expression in den mikroskopisch fluoreszierenden im Vergleich zu den nicht-fluoreszierenden Bereichen:
 $2^{-[(25,379-26,760)-(24,283-25,699)]} = 0,98$ beziehungsweise
 $2^{-[(28,964-26,760)-(28,684-25,699)]} = 1,72$ beziehungsweise
 $2^{-[(26,478-26,760)-(26,423-25,699)]} = 2,01$.

Im Mittel über sämtliche Individuen ergab sich für IL-10 eine 1,2-, für IL-12 eine 1,8- und für IFN- γ eine 2,0-fache Expression in den mikroskopisch fluoreszierenden im Vergleich zu den nicht-fluoreszierenden Bereichen (siehe Abbildung 3.4 auf Seite 42; Berechnung analog zu [Schmittgen u. Livak, 2008](#)):

- IL-10:

$$\begin{aligned} & \left[\frac{(2^{-\Delta C_T})_{\phi} + (2^{-\Delta C_T})_{\chi} + (2^{-\Delta C_T})_{\psi} + (2^{-\Delta C_T})_{\omega}}{4} \right]_{\text{fluoreszierend}} / \\ & \left[\frac{(2^{-\Delta C_T})_{\phi} + (2^{-\Delta C_T})_{\chi} + (2^{-\Delta C_T})_{\psi} + (2^{-\Delta C_T})_{\omega}}{4} \right]_{\text{nicht fluoreszierend}} = \\ & = \frac{1,369+0,896+0,0499+2,604}{4} / \frac{1,144+0,357+0,0228+2,668}{4} = \\ & = 1,173 \end{aligned}$$

- IL-12:

$$\begin{aligned} & \frac{0,0393+0,0678+0,00577+0,212}{4} / \frac{0,0198+0,0343+0,00340+0,126}{4} = \\ & = 1,795 \end{aligned}$$

- IFN- γ :

$$\begin{aligned} & \frac{(0,269+0,406+0,104+1,216)}{4} / \frac{0,159+0,200+0,0296+0,605}{4} = \\ & = 2,009 \end{aligned}$$

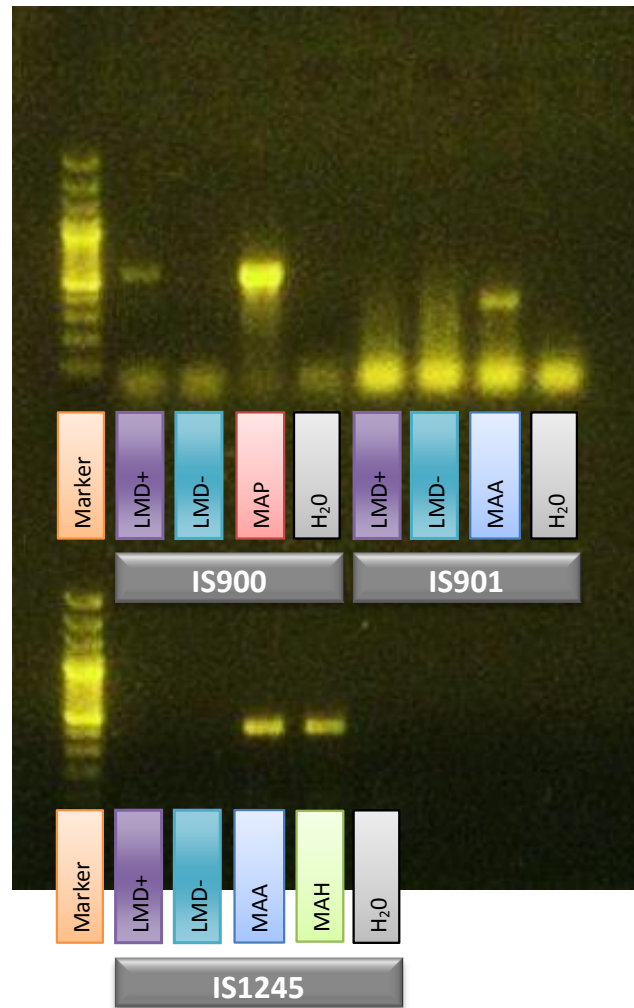


Abbildung 3.1.: Das mit ultraviolettem Licht angeregte Gel aus der Gelelektrophorese nach der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Insertionssequenz-(IS-)900-, IS-901- bzw. IS-1245-Primern zeigt Banden im Sinne eines positiven Nukleinsäure-Nachweises in den mit dem Produkt aus Reaktionen der entsprechenden Positiv-Kontrollen beladenen Bahnen (**MAP**, **MAA**, **MAH**), sowie eine Bande in der Bahn mit dem Produkt der IS-900-PCR mit einer Probe aus mit MAP-spezifischem Antikörper gefärbten und fluoreszierenden mikrodisssezierten Arealen (**LMD+**). Keine entsprechenden Nukleinsäuren wurden gefunden in den Negativ-Kontrollen (**H₂O**), in den Bahnen mit dem Produkt aus Reaktionen mit DNA aus nicht fluoreszierenden Arealen (**LMD-**), sowie in Bahnen mit dem Produkt aus den IS-901- und -1245-PCR mit Proben aus fluoreszierenden Arealen.

Tabelle 3.1.: Spezifität der Insertionssequenzen (IS) 900, 901 und 1245 für *Mycobacterium-avium*-Subspezies

Subspezies	Insertionssequenz(en)		
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	IS900	-	-
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	-	IS901	IS1245
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	-	-	IS1245

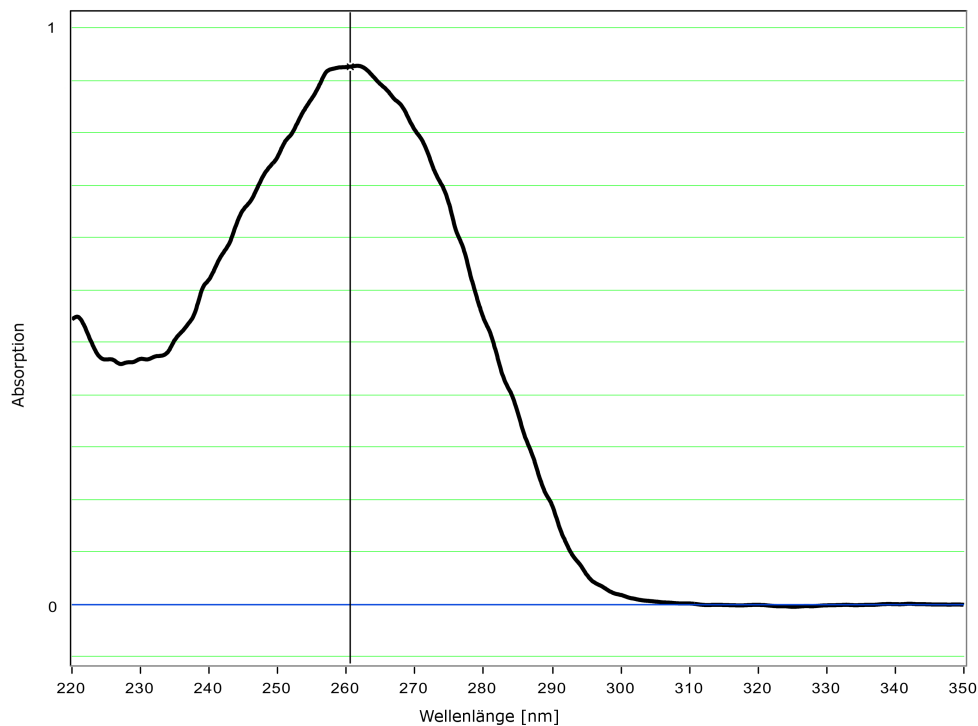


Abbildung 3.2.: Spektrophotometrische Messung von komplementärer DNA aus einem mikrodisezierten Jejunum-Gefrierschnitt (Individuum 09Zi0091 ϕ , nicht fluoreszierende Areale): Die Abbildung stellt exemplarisch den typischen Kurvenverlauf bei Messung von DNA dar. Die Nukleinsäurekonzentration in der Probe betrug 821 ng/ μ l. Auf der Abszisse ist die Wellenlänge in nm abgetragen, die Ordinate gibt die Absorption - genormt auf eine 10 mm Schichtdicke - wieder. Bei Anregung mit einer Wellenlänge von 260 nm ist bei Nukleinsäuren die höchste Absorption zu erwarten. Die Probe kann aufgrund der Quotienten der Absorptionswerte 260/280 von 1,88 und 260/230 von 2,19 als ausreichend rein für die weitere Analyse angesehen werden.

Tabelle 3.2.: Durchschnittliche Threshold-Cycle-Werte (C_T -Werte) der einzelnen Reaktionseinheiten mit komplementärer DNA aus mikrodisssezierten Jejunum-Arealen von vier verschiedenen Individuen (zur besseren Übersichtlichkeit auf drei Dezimalstellen gerundet; r18S: ribosomale RNA von 18 Svedberg; IL-10: Interleukin 10; IL-12: Interleukin 12; IFN- γ : Interferon γ)

Individuum		Fluoreszenz	Gen	C_T -Wert
09Zi0091	φ	+	r18S	25,937
09Zi0091	φ	-	r18S	25,627
09Zi0091	φ	+	IL-10	25,484
09Zi0091	φ	-	IL-10	25,433
09Zi0091	φ	+	IL-12	30,605
09Zi0091	φ	-	IL-12	31,285
09Zi0091	φ	+	IFN- γ	27,831
09Zi0091	φ	-	IFN- γ	28,284
10Zi0932	χ	+	r18S	24,400
10Zi0932	χ	-	r18S	23,966
10Zi0932	χ	+	IL-10	24,558
10Zi0932	χ	-	IL-10	25,454
10Zi0932	χ	+	IL-12	28,282
10Zi0932	χ	-	IL-12	28,833
10Zi0932	χ	+	IFN- γ	25,699
10Zi0932	χ	-	IFN- γ	26,291
10Zi0935	ψ	+	r18S	23,909
10Zi0935	ψ	-	r18S	23,334
10Zi0935	ψ	+	IL-10	28,262
10Zi0935	ψ	-	IL-10	28,788
10Zi0935	ψ	+	IL-12	31,347
10Zi0935	ψ	-	IL-12	31,536
10Zi0935	ψ	+	IFN- γ	27,169
10Zi0935	ψ	-	IFN- γ	28,410
10Zi0936	ω	+	r18S	26,760
10Zi0936	ω	-	r18S	25,699
10Zi0936	ω	+	IL-10	25,379
10Zi0936	ω	-	IL-10	24,283
10Zi0936	ω	+	IL-12	28,964
10Zi0936	ω	-	IL-12	28,684
10Zi0936	ω	+	IFN- γ	26,478
10Zi0936	ω	-	IFN- γ	26,423

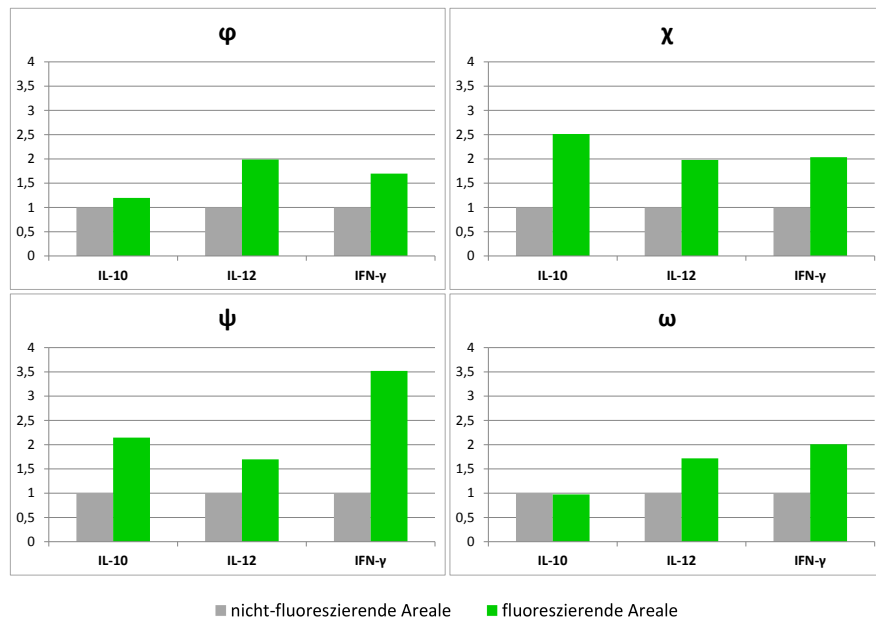


Abbildung 3.3.: (n-fache) Expression von Interleukin (IL-)10, Interleukin 12 und Interferon (IFN-) γ in den vier Individuen 09Zi0091 φ , 10Zi0932 χ , 10Zi0935 ψ und 10Zi0936 ω in nicht-fluoreszierenden Bereichen (**graue Balken**) und fluoreszierenden Arealen (**grüne Balken**).

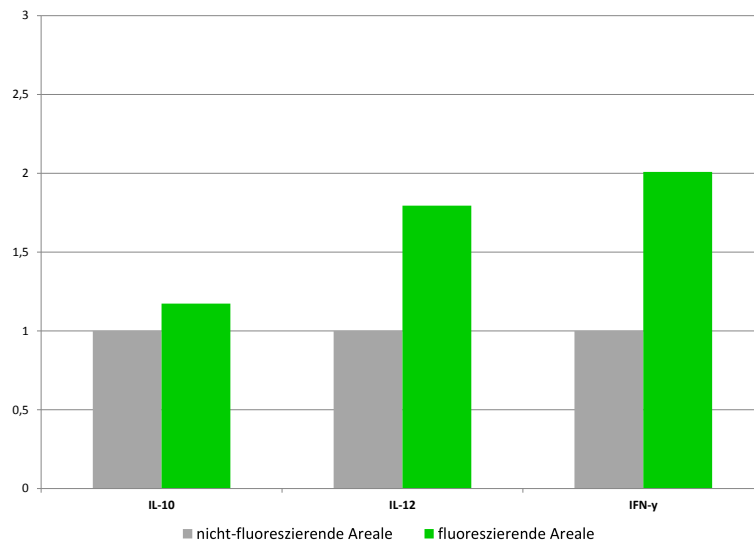


Abbildung 3.4.: (n-fache) Expression von Interleukin (IL-)10, Interleukin 12 und Interferon (IFN-) γ , gemittelt über vier Individuen (09Zi0091 φ ; 10Zi0932 χ ; 10Zi0935 ψ ; 10Zi0936 ω), in mikroskopisch fluoreszierenden Arealen (**grüne Balken**) und nicht-fluoreszierenden Bereichen (**graue Balken**).

3.1.3. Immunhistochemische MAP-Detektion und CD8-Lokalisation

Abbildung 3.6 (Seite 44) zeigt die zur Darstellung von MAP mit MAP-Antikörper und Fluoreszenzfarbstoff gefärbten Gefrierschnitte, die unmittelbar nach den Schnitten für die Lasermikrodissektion erstellt wurden. Es zeigte sich eine Überlagerung einer hintergründigen Autofluoreszenz durch die spezifische MAP-Antikörper-Färbung (siehe Abbildung 3.5 auf Seite 43). Ebenfalls mit MAP-Antikörper und Fluoreszenzfarbstoff gefärbt wurden Gefrierschnitte des Jejunums von Individuum 10Zi0932 χ unter zusätzlicher Verwendung von Antikörpern gegen das Oberflächenprotein CD8: Abbildung 3.7 auf Seite 45.

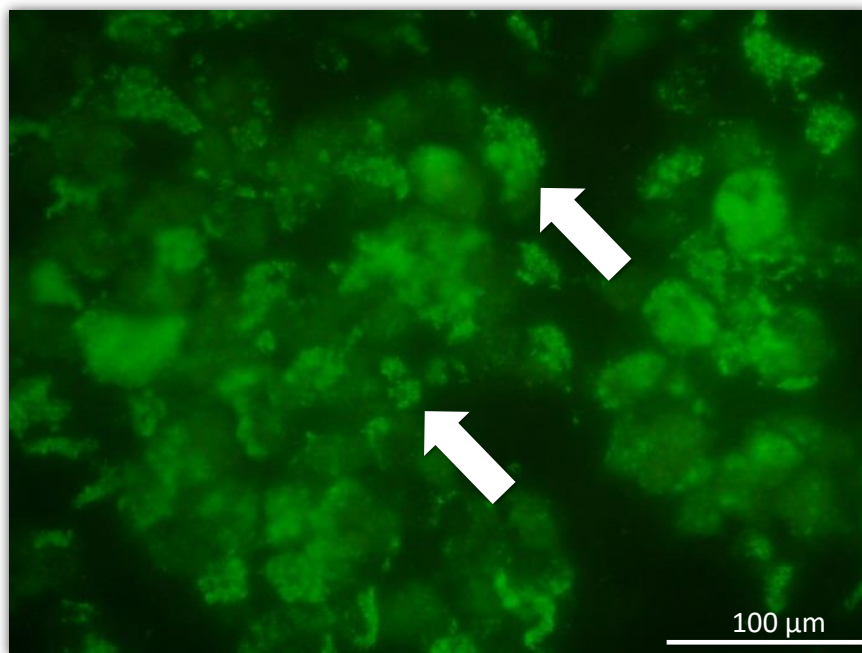


Abbildung 3.5.: Immunfluoreszenzfärbung mit MAP-spezifischem Antikörper: Die Autofluoreszenz (**dunkelgrün**) wird überlagert von den spezifisch angefärbten Mykobakterien-Bestandteilen (**hellgrün**; repräsentative Areale sind durch Pfeile markiert).

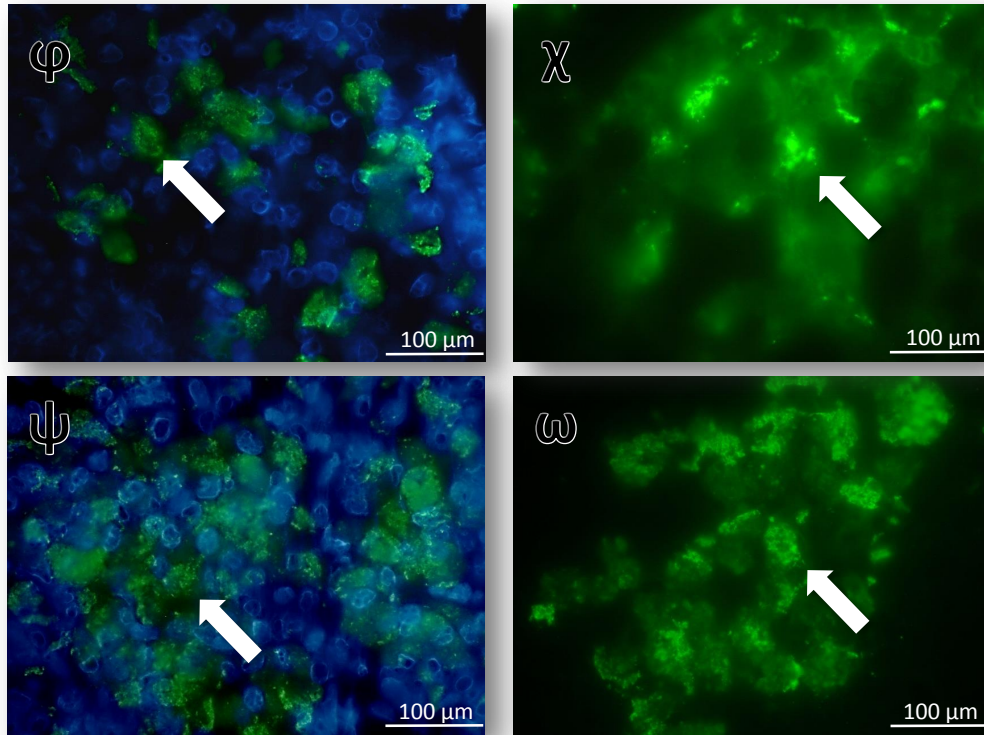


Abbildung 3.6.: Immunhistochemie mit Mycobacterium-avium-subspecies-paratuberculosis-(MAP-)Antikörper von Gefrierschnitten der vier untersuchten Individuen 09Zi0091φ, 10Zi0932χ, 10Zi0935ψ und 10Zi0936ω: Gefrierschnitte, die unmittelbar nach Anfertigung der Schnitte für die Lasermikrodissektion angefertigt wurden, wurden zum immunhistochemischen Nachweis von MAP mit MAP-Antikörper und Fluoreszenzfarbstoff (**grün**; repräsentative Areale sind durch Pfeile markiert) gefärbt. Zusätzlich wurden bei den Individuen 09Zi0091φ und 10Zi0935ψ die Zellkerne mittels 4,6-Diamidin-2-phenylindol (**blau**) dargestellt.

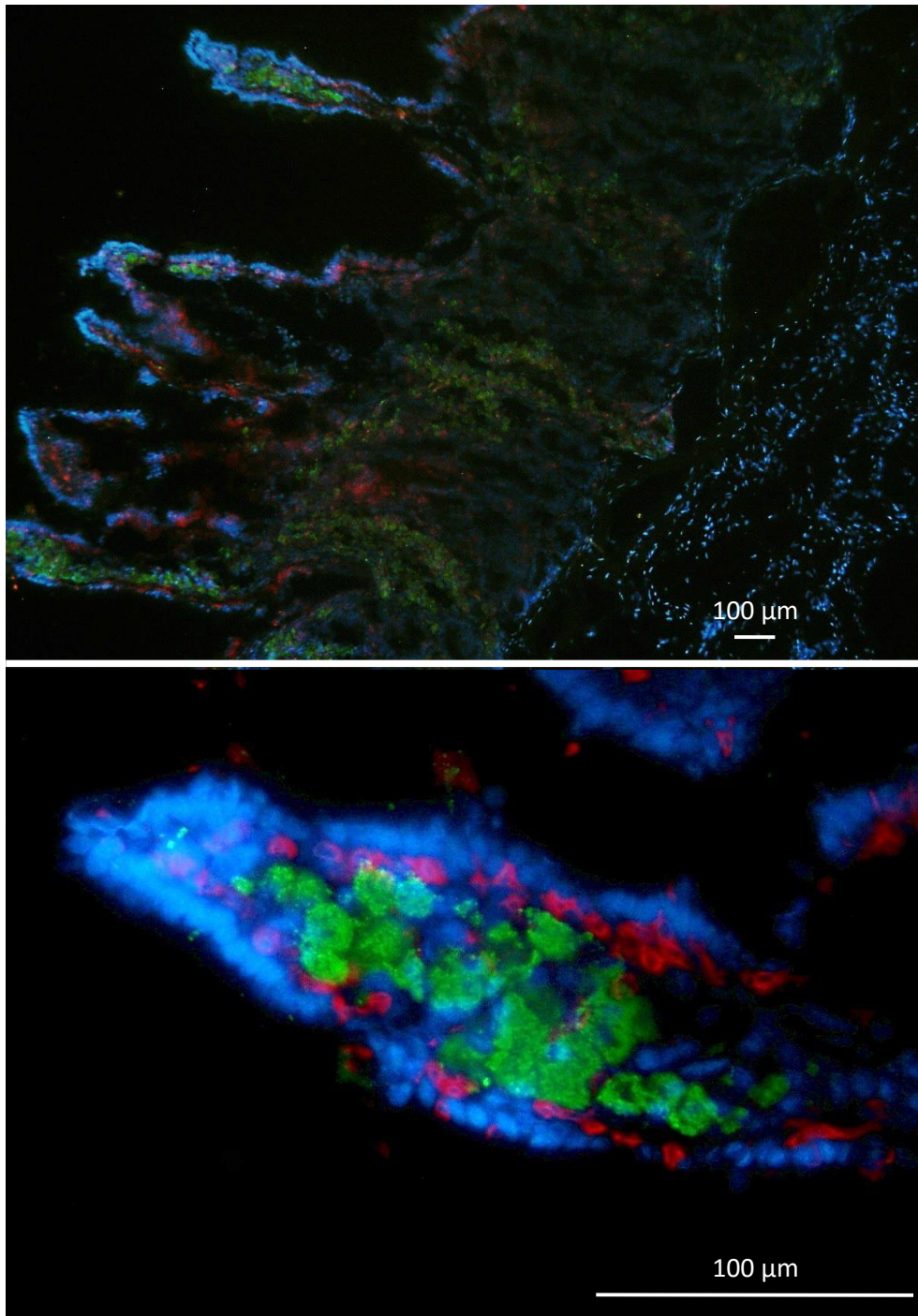


Abbildung 3.7.: Immunhistochemie mit MAP- und Cluster-of-differentiation-8-Immunfärbung: Übersicht (oben) und Ausschnitt daraus (unten). Verwendet wurden Antikörper gegen MAP (**grün**) und den Oberflächenmarker Cluster of Differentiation 8 (**rot**), sowie der DNA-Farbstoff 4,6-Diamidin-2-phenylindol (**blau** fluoreszierend).

Tabelle 3.3.: regionale Verteilung der hepatischen Endoplasmatisches-Retikulum-Stress-Parameter: Übersicht zu mikroskopischer Fläche, RNA-Konzentration und -Qualität, cDNA-Konzentration und -Qualität, sowie prozentualem Unterschied (cDNA: komplementäre DNA; c_{RNA} : RNA-Konzentration; c_{cDNA} : Konzentration der komplementären DNA)

Herkunft	Fläche [μm^2]	c_{RNA} [ng/ μl]	RNA 260/280	c_{cDNA} [ng/ μl]	cDNA 260/280
periportal	533,192	5,64	1,74	1300,08	1,85
perizentral	533,425	5,05	1,84	1349,90	1,91
(Unterschied)	0,045 %	10,5 %	5,44 %	3,69 %	3,14 %

3.2. LHBs-Expression in der Leber transgener Mäuse

3.2.1. Quantifizierung von regionalen hepatischen ER-Stress-Parametern

Laser-Mikrodissektion

Mikrodisseziert wurden 533,19 μm^2 beziehungsweise 533,43 μm^2 (Unterschied: 0,045 %) für die Bereiche um Portalvenen bzw. Zentralvenen. Die maximale Dauer der Laser-Mikrodissektion, vom Zeitpunkt der vollständigen Trocknung der gefärbten Schnitte bis zur Entnahme der Reaktionsgefäße mit den Mikrodissektaten, betrug 44 Minuten.

RNA-Analyse

Isoliert wurde RNA mit einer Konzentration von 5,64 ng/ μl (periportal) bzw. 5,05 ng/ μl (perizentral; Unterschied: 10,5 %) und 260/280-Quotienten von 1,74 (periportal) bzw. 1,84 (perizentral).

cDNA-Analyse

Die erhaltene cDNA wies eine Konzentration von 1300,08 ng/ μl (periportal) bzw. 1349,90 ng/ μl (perizentral; Unterschied: 3,69 %) auf mit 260/280-Quotienten von 1,85 (periportal) bzw. 1,91 (perizentral). Eine Übersicht zu mikrodissezierter Fläche, Konzentration und Absorptions-Quotienten von RNA und cDNA bietet Tabelle 3.3, Seite 46.

quantitative Real-Time-PCR

Aus den C_T -Werten der jeweiligen Proben wurde über Triplikate (je drei Reaktionsgefäße mit gleichem Reaktionsansatz) das arithmetische Mittel errechnet (auf drei Nachkommastellen gerundet):

- $(C_T, GAPDH)_{periportal} = 17,775$
- $(C_T, GAPDH)_{perizentral} = 17,573$
- $(C_T, ATF-3)_{periportal} = 32,740$
- $(C_T, ATF-3)_{perizentral} = 30,580$
- $(C_T, DDIT-3)_{periportal} = 29,469$
- $(C_T, DDIT-3)_{perizentral} = 28,158$

Es wurde die n-fache Expression der Zielgene ATF-3 und DDIT-3 in periportalen Arealen im Vergleich zur Expression in perizentralen Bereichen ermittelt, indem diese jeweils zum Referenzgen GAPDH in Bezug gesetzt wurde (zur besseren Übersichtlichkeit auf drei Nachkommastellen gerundet):

$$\begin{aligned} 2^{-\Delta\Delta C_T} &= 2^{-[(C_T, ATF-3 - C_T, GAPDH)_{perizentral}] - [(C_T, ATF-3 - C_T, GAPDH)_{periportal}]} \\ &= 2^{-[(30,580 - 17,573) - (32,740 - 17,775)]} \\ &= 3,885 \end{aligned}$$

beziehungsweise

$$\begin{aligned} 2^{-\Delta\Delta C_T} &= 2^{-[(C_T, DDIT-3 - C_T, GAPDH)_{perizentral}] - [(C_T, DDIT-3 - C_T, GAPDH)_{periportal}]} \\ &= 2^{-[(28,158 - 17,573) - (29,469 - 17,775)]} \\ &= 2,157 \end{aligned}$$

Somit ergab sich für ATF-3 eine 3,9-fache und für DDIT-3 eine 2,2-fache Expression in perizentralen Bereichen im Vergleich zu periportalen Arealen (siehe Abbildung 3.8, Seite 48).

3.2.2. Expression von ER-Stress-Parametern in Abhängigkeit von der Entfernung zur Vena centralis

Laser-Mikrodissektion

Maximal dauerte die Laser-Mikrodissektion - vom Zeitpunkt der vollständigen Trocknung der gefärbten Schnitte bis zur Entnahme der Reaktionsgefäße mit den Mikrodissektaten - 58 Minuten. Ausgeschnitten wurden

- Zone α mit einer Fläche von $29.282 \mu\text{m}^2$ (Mittelwert über drei Durchläufe; 95%-Konfidenzintervall: $28.993 - 29.571 \mu\text{m}^2$)
- Zone β mit einer Fläche von $29.183 \mu\text{m}^2$ (Mittelwert über drei Durchläufe; 95%-Konfidenzintervall: $28.658 - 29.708 \mu\text{m}^2$)
- Zone γ mit einer Fläche von $29.458 \mu\text{m}^2$ (Mittelwert über drei Durchläufe; 95%-Konfidenzintervall: $29.072 - 29.844 \mu\text{m}^2$)
- Zone δ mit einer Fläche von $29.321 \mu\text{m}^2$ (Mittelwert über drei Durchläufe; 95%-Konfidenzintervall: $28.821 - 29.820 \mu\text{m}^2$).

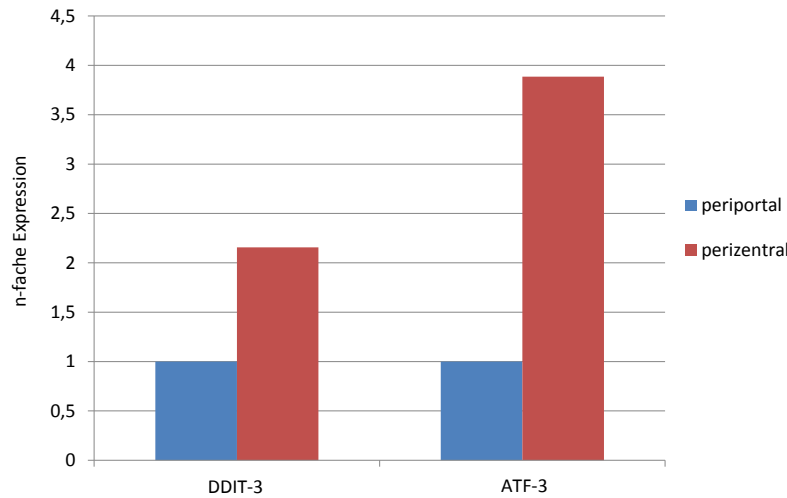


Abbildung 3.8.: Vergleich der Genexpression (relative Ausprägung) von activating transcription factor 3 (ATF-3) und DNA-damage-inducible transcript 3 (DDIT-3) in periportalen (**blau**) und perizentralen (**rot**) Arealen.

RNA-Analyse

Isoliert wurde RNA mit einer Konzentration zwischen 2,27 ng/ μ l und 14,77 ng/ μ l (Mittelwert: 5,34 ng/ μ l; 95%-Konfidenzintervall: 3,27 - 7,41 ng/ μ l) und 260/280-Quotienten zwischen 1,24 und 2,64 (Mittelwert: 1,80; 95%-Konfidenzintervall: 1,52 - 2,07).

cDNA-Analyse

mRNA wurde in cDNA umgeschrieben mit einer Konzentration zwischen 1027,37 ng/ μ l und 1341,14 ng/ μ l (Mittelwert: 1162,61 ng/ μ l; 95%-Konfidenzintervall: 1080,42 - 1244,81 ng/ μ l) und 260/280-Quotienten zwischen 1,82 und 1,90 (Mittelwert: 1,86; 95%-Konfidenzintervall: 1,85 - 1,88). Details zu den verwendeten Proben hinsichtlich mikrodissasierter Fläche, Konzentration und Absorptions-Quotienten von RNA und cDNA sind in Tabelle 3.4 (Seite 49) dargestellt.

quantitative Real-Time-PCR

Aus den C_T -Werten der jeweiligen Proben wurde über Triplikate (jeweils drei Reaktionsgefäße mit gleichem Reaktionsansatz) das arithmetische Mittel errechnet. Wurde von der qRT-PCR-Software (siehe Anhang H, Seite 105) eine hohe Standardabweichung innerhalb der drei Replikate detektiert, so wurde der Einzelwert mit der größten Abweichung bei der

Tabelle 3.4.: Perizentrale Verteilung der hepatischen Endoplasmatisches-Retikulum-Stress-Parameter: Analyse der Proben hinsichtlich mikrodissasierter Fläche, RNA-Konzentration und -Qualität, cDNA-Konzentration und -Qualität (cDNA: komplementäre DNA; c_{RNA} : RNA-Konzentration; c_{cDNA} : Konzentration der komplementären DNA)

Durchlauf	Zone	Fläche [μm^2]	c_{RNA} [ng/ μl]	RNA 260/280	c_{cDNA} [ng/ μl]	DNA 260/280
1	α	171.626	3,56	1,24	1341,14	1,88
1	β	167.184	3,54	1,54	1335,12	1,86
1	γ	171.453	3,69	1,37	1301,77	1,87
1	δ	167.750	5,58	1,54	1336,27	1,89
2	α	207.344	6,57	2,38	1082,56	1,86
2	β	209.886	14,77	1,75	1080,08	1,89
2	γ	210.983	6,31	2,02	1059,98	1,86
2	δ	210.482	3,76	1,99	1105,64	1,90
3	α	206.669	3,83	2,64	1041,86	1,83
3	β	206.590	5,91	1,53	1027,37	1,82
3	γ	206.725	2,27	1,47	1051,19	1,83
3	δ	208.178	4,30	2,10	1188,39	1,85

Berechnung des Mittelwerts nicht berücksichtigt. Die jeweiligen durchschnittlichen C_T -Werte sind in Tabelle 3.5 auf Seite 50 angegeben.

Es wurde die n-fache Expression der Zielgene ATF-3 und DDIT-3 in den Zonen β , γ und δ in Relation zur Expression in der innersten Zone α ermittelt, indem diese jeweils zum Referenzgen GAPDH in Bezug gesetzt wurde (Zahlenwerte jeweils auf drei Dezimalstellen gerundet zur besseren Übersichtlichkeit):

- **Zone β :**

1. Durchlauf, ATF-3:

$$\begin{aligned}
 2^{-\Delta\Delta C_T} &= 2^{-[(C_{T, ATF-3} - C_{T, GAPDH})_{\alpha}] - [(C_{T, ATF-3} - C_{T, GAPDH})_{\beta}]} \\
 &= 2^{-[(31,038 - 16,463) - (29,676 - 15,911)]} \\
 &= 0,570
 \end{aligned}$$

1. Durchlauf, DDIT-3:

$$\begin{aligned}
 2^{-\Delta\Delta C_T} &= 2^{-[(C_{T, DDIT-3} - C_{T, GAPDH})_{\alpha}] - [(C_{T, DDIT-3} - C_{T, GAPDH})_{\beta}]} \\
 &= 2^{-[(29,230 - 16,463) - (28,169 - 15,911)]} \\
 &= 0,703
 \end{aligned}$$

$$2. \text{ Durchlauf, ATF-3: } 2^{-[(30,509 - 16,004) - (29,082 - 16,294)]} = 0,304$$

Tabelle 3.5.: Durchschnittliche Threshold-Cycle-Werte (C_T -Werte) der Proben aus vier perizentralen Zonen im jeweiligen Durchlauf und der jeweiligen Zone (zur besseren Übersichtlichkeit auf drei Dezimalstellen gerundet; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; ATF-3: activating transcription factor 3; DDIT-3: DNA-damage-inducible transcript 3)

Durchlauf	Zone	Gen	C_T -Wert
1	α	GAPDH	16,463
1	α	ATF-3	31,038
1	α	DDIT-3	29,230
1	β	GAPDH	15,911
1	β	ATF-3	29,676
1	β	DDIT-3	28,169
1	γ	GAPDH	15,970
1	γ	ATF-3	30,154
1	γ	DDIT-3	28,608
1	δ	GAPDH	16,265
1	δ	ATF-3	30,554
1	δ	DDIT-3	28,808
2	α	GAPDH	16,004
2	α	ATF-3	30,509
2	α	DDIT-3	28,791
2	β	GAPDH	16,294
2	β	ATF-3	29,082
2	β	DDIT-3	27,928
2	γ	GAPDH	16,355
2	γ	ATF-3	28,806
2	γ	DDIT-3	27,847
2	δ	GAPDH	16,280
2	δ	ATF-3	28,745
2	δ	DDIT-3	28,059
3	α	GAPDH	19,958
3	α	ATF-3	30,162
3	α	DDIT-3	28,040
3	β	GAPDH	19,879
3	β	ATF-3	30,086
3	β	DDIT-3	27,762
3	γ	GAPDH	20,433
3	γ	ATF-3	29,469
3	γ	DDIT-3	28,447
3	δ	GAPDH	21,670
3	δ	ATF-3	29,932
3	δ	DDIT-3	29,197

2. Durchlauf DDIT-3: $2^{-[(28,791-16,004)-(27,928-16,294)]} = 0,450$

3. Durchlauf, ATF-3: $2^{-[(30,162-19,958)-(30,086-19,879)]} = 1,002$

3. Durchlauf, DDIT-3: $2^{-[(28,040-19,958)-(27,762-19,879)]} = 0,871$

• **Zone γ :**

1. Durchlauf, ATF-3:

$$\begin{aligned} 2^{-\Delta\Delta C_T} &= 2^{-[(C_{T, ATF-3} - C_{T, GAPDH})_{\alpha}] - [(C_{T, ATF-3} - C_{T, GAPDH})_{\gamma}]} \\ &= 2^{-[(31,038-16,463)-(30,154-15,970)]} \\ &= 0,763 \end{aligned}$$

1. Durchlauf, DDIT-3:

$$\begin{aligned} 2^{-\Delta\Delta C_T} &= 2^{-[(C_{T, DDIT-3} - C_{T, GAPDH})_{\alpha}] - [(C_{T, DDIT-3} - C_{T, GAPDH})_{\gamma}]} \\ &= 2^{-[(29,230-16,463)-(28,608-15,970)]} \\ &= 0,915 \end{aligned}$$

2. Durchlauf, ATF-3: $2^{-[(30,509-16,004)-(28,806-16,355)]} = 0,241$

2. Durchlauf, DDIT-3: $2^{-[(28,791-16,004)-(27,847-16,355)]} = 0,408$

3. Durchlauf, ATF-3: $2^{-[(30,162-19,958)-(29,469-20,433)]} = 0,445$

3. Durchlauf, DDIT-3: $2^{-[(28,040-19,958)-(28,447-20,433)]} = 0,954$

• **Zone δ :**

1. Durchlauf, ATF-3:

$$\begin{aligned} 2^{-\Delta\Delta C_T} &= 2^{-[(C_{T, ATF-3} - C_{T, GAPDH})_{\alpha}] - [(C_{T, ATF-3} - C_{T, GAPDH})_{\delta}]} \\ &= 2^{-[(31,038-16,463)-(30,554-16,265)]} \\ &= 0,820 \end{aligned}$$

1. Durchlauf, DDIT-3:

$$\begin{aligned} 2^{-\Delta\Delta C_T} &= 2^{-[(C_{T, DDIT-3} - C_{T, GAPDH})_{\alpha}] - [(C_{T, DDIT-3} - C_{T, GAPDH})_{\delta}]} \\ &= 2^{-[(29,230-16,463)-(28,808-16,265)]} \\ &= 0,856 \end{aligned}$$

2. Durchlauf, ATF-3: $2^{-[(30,162-16,004)-(28,745-16,280)]} = 0,243$

2. Durchlauf, DDIT-3: $2^{-[(28,791-16,004)-(28,059-16,280)]} = 0,497$

3. Durchlauf, ATF-3: $2^{-[(30,162-19,958)-(29,932-21,670)]} = 0,260$

3. Durchlauf, DDIT-3: $2^{-[(28,040-19,958)-(29,197-21,670)]} = 0,681$

Somit ergab sich (gemittelt über drei Durchläufe) für ATF-3 - jeweils im Vergleich zu Zone α - eine 2,0-fache Expression in Zone β , eine 2,6-fache in Zone γ und eine 3,1-fache Expression in Zone δ . Die Expression von DDIT-3 ist dagegen im Vergleich zu Zone α in Zone β 1,6-fach und in den Zonen γ und δ 1,5-fach ausgeprägt (siehe Abbildung 3.9, Seite 52). Detaillierte Ergebnisse zu den einzelnen Durchläufen lassen sich aus Tabelle 3.6 (Seite 53) entnehmen.

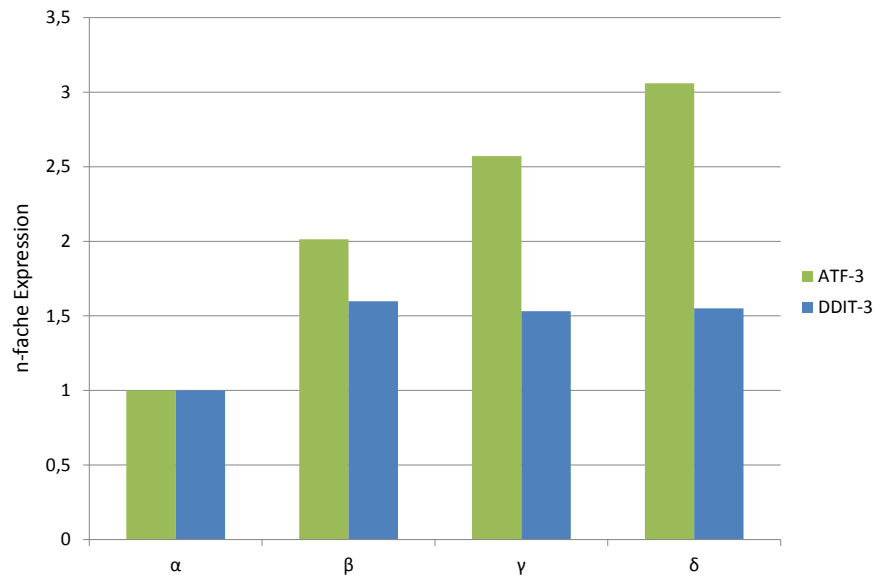


Abbildung 3.9.: Vergleich der Genexpression (relative Ausprägung) von activating transcription factor 3 (ATF-3; **grün**) und DNA-damage-inducible transcript 3 (DDIT-3; **blau**) in perizentralen Zonen (α bis δ).

Tabelle 3.6.: Durchschnittliche n-fache Expression der Gene ATF-3 und DDIT-3 über vier perizentrale Zonen: Aufgeführt sind die jeweils n-fache Expression des entsprechenden Genes in Relation zur Expression in Zone α für jede Zone im jeweiligen Durchlauf (ATF-3: activating transcription factor 3; DDIT-3: DNA-damage-inducible transcript 3).

Durchlauf	Zone	Gen	n-fache Expression
1	α	ATF-3	1,00
1	α	DDIT-3	1,00
1	β	ATF-3	1,75
1	β	DDIT-3	1,42
1	γ	ATF-3	1,31
1	γ	DDIT-3	1,09
1	δ	ATF-3	1,21
1	δ	DDIT-3	1,17
2	α	ATF-3	1,00
2	α	DDIT-3	1,00
2	β	ATF-3	3,29
2	β	DDIT-3	2,22
2	γ	ATF-3	4,15
2	γ	DDIT-3	2,45
2	δ	ATF-3	4,11
2	δ	DDIT-3	2,01
3	α	ATF-3	1,00
3	α	DDIT-3	1,00
3	β	ATF-3	1,00
3	β	DDIT-3	1,15
3	γ	ATF-3	2,25
3	γ	DDIT-3	1,05
3	δ	ATF-3	3,84
3	δ	DDIT-3	1,47

3.2.3. Lokalisation von ER-Stress-Parametern in der Immunhistochemie

Abbildungen 3.10 (ATF-3; Seite 54) und 3.11 (DDIT-3; Seite 55) zeigen das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung von Gefrierschnitten, die in direkter Folge zu den für die LMD verwendeten angefertigt wurden, mit Antikörpern gegen den entsprechenden ER-Stress-Parameter.

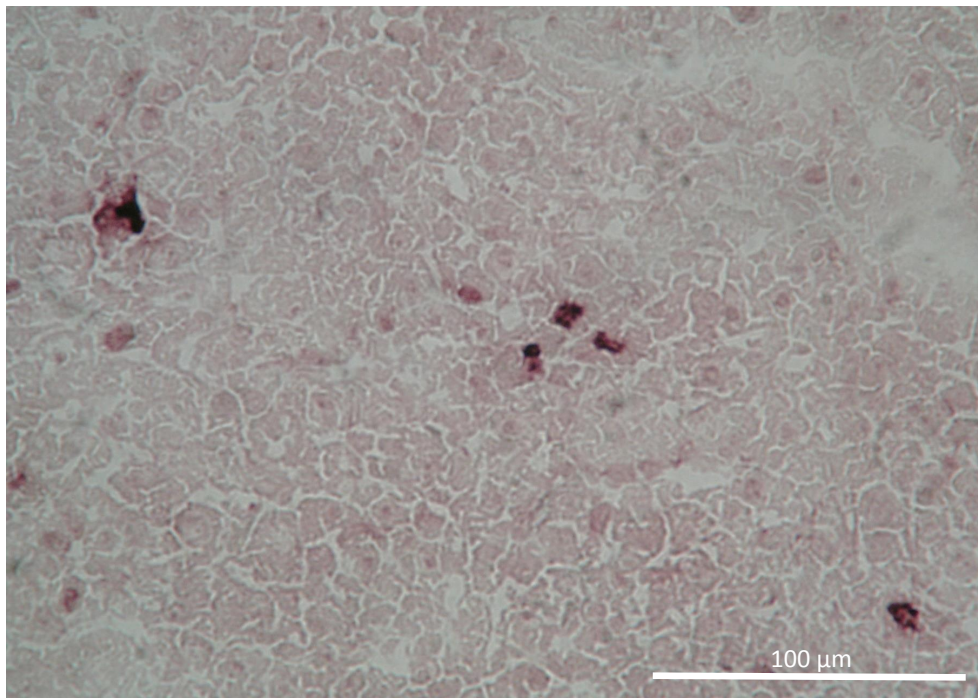


Abbildung 3.10.: Immunhistochemische Färbung mit Primär-Antikörpern gegen activating transcription factor (ATF-3) eines Leber-Gefrierschnittes, der in direkter Folge zu den für die LMD genutzten angefertigt wurde. Zentral lässt sich ein perizentraler Bereich mit ATF-3-Anfärbung erkennen.

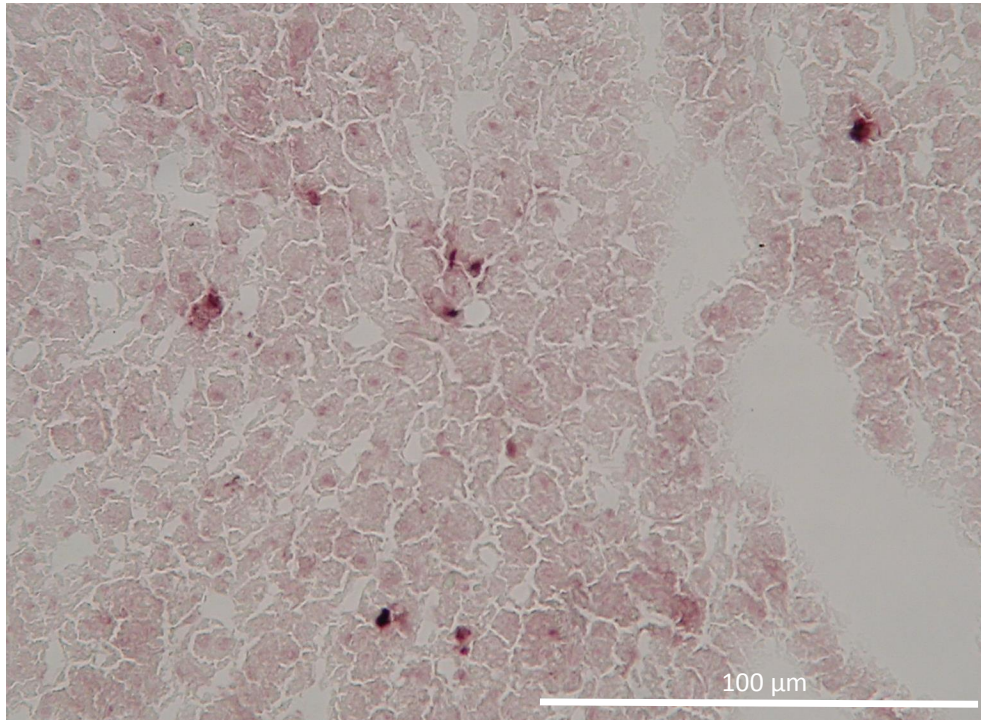


Abbildung 3.11.: Immunhistochemische Färbung mit Primär-Antikörpern gegen DNA-damage-inducible transcript 3 (DDIT-3) eines Leber-Gefrier-Schnittes, der in direkter Folge zu den für die LMD genutzten angefertigt wurde. Zentral lässt sich ein perizentraler Bereich mit DDIT-3-Anfärbung erkennen, während sich um weitere im Bild befindliche Zentralvenen keine vermehrte Anfärbung zeigt.

Kapitel 4.

Diskussion

4.1. MAP-Infektion im Jejunum von Ziegen

4.1.1. MAP-DNA in betroffenen Arealen und Abwesenheit anderer mykobakterieller DNA

Spezifität der Insertionsssequenzen für Subspezies von *Mycobacterium avium*

Insertionssequenzen sind kurze DNA-Abschnitte, die als Transposons innerhalb eines Genoms beweglich sind. Sie werden zur Typisierung von Mikroorganismen eingesetzt ([Motiwala u. a., 2006](#)). Durch die Identifizierung von Insertionssequenzen kann zwischen Subspezies des MAC differenziert werden ([Moravkova u. a., 2008](#)). Tabelle 3.1 auf Seite 40 bietet einen Überblick über das Vorliegen der Insertionssequenzen 900, 901 und 1245 in der DNA von MAC-Subspezies.

Für MAP ist die IS900 spezifisch ([Möbius u. a., 2008](#)). IS901 ([Moravkova u. a., 2008](#)) und IS1245 ([Johansen u. a., 2005](#)) werden in der MAP-DNA dagegen nicht gefunden. Im MAA-Genom kommen IS901 ([Ahrens u. a., 1995](#)) und IS1245 ([Slana u. a., 2010](#)) vor, nicht hingegen IS900 ([Moravkova u. a., 2008](#)). MAH-DNA enthält das Gen IS1245 ([Agdestein u. a., 2012](#)), IS900 und IS901 werden hierin nicht gefunden ([Moravkova u. a., 2008](#)).

MAP-spezifische Insertionsequenz in mikrodisezierten Proben

Die PCR mit anschließender Gelelektrophorese brachte den Nachweis von MAP-DNA in den mikrodisezierten fluoreszierenden Arealen. Das Mitführen einer Probe aus entsprechender Mykobakterien-Kultur als Positiv-Kontrolle und einer Reaktion mit destilliertem Wasser als Negativ-Kontrolle diente dem Nachweis der korrekt abgelaufenen Reaktion.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die fluoreszierenden Areale die lokale Präsenz von MAP darstellen, die nicht-fluoreszierenden Areale dagegen praktisch frei von mykobakteriellen Bestandteilen sind. Hinweise für das Vorliegen von *Mycobacterium avium subspecies avium* bzw. *subspecies humanissuis* in den Jejunum-Proben ergaben sich nicht.

4.1.2. Co-Lokalisation von Autofluoreszenz und MAP-Immunfluoreszenzfärbung

Eine nukleinsäureschonende und schnelle Probenverarbeitung bei gleichzeitig effizienter mikroskopischer Identifikation der MAP-betroffenen Areale gelang aufgrund der Autofluoreszenz der betroffenen Bereiche, die es ermöglichte auf eine spezifische Anfärbung zu verzichten. Abbildung 3.5, Seite 43, veranschaulicht die Co-Lokalisation von Autofluoreszenz und MAP-Immunfluoreszenzfärbung mit MAP-Antikörper. Vermutlich stellen Ceroid-Pigmente innerhalb der infizierten Makrophagen das Korrelat für die gelb-grüne Fluoreszenz bei entsprechender Anregung dar (Katz u. Robison, 2002). Autofluoreszenz ist für *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) beschrieben und zeigte in einer Untersuchung von Joshi u. a. (2013) an Feinnadelaspirationsbiopтатаen von 80 Patienten mit der klinischen Diagnose einer tuberkulösen Lymphadenitis eine signifikant höhere Sensitivität in der Detektion von MTB als die klassische Ziehl-Neelsen-Färbung für säurefeste Stäbchen.

4.1.3. Gleichzeitige Detektion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen als MAP-typische Beobachtung

Die gleichzeitige Detektion von pro- (IFN- γ und IL-12) und antiinflammatorischen (IL-10) Zytokinen in MAP-positiven Arealen erscheint zunächst paradox. Jedoch ist diese Beobachtung bereits für MTB und MAP gemacht worden: Barnes u. a. (1993) wiesen in Pleuraexsudat von Patienten mit tuberkulöser Pleuritis eine gleichsinnig veränderte IL-10- und IFN- γ -Produktion in einem die Serum-Konzentration übertreffenden Maß nach. In Lymphknoten von Tuberkulose-Patienten konnte - unabhängig vom Vorliegen einer Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) - ebenfalls eine erhöhte IFN- γ , IL-10 und IL-12-Expression detektiert werden. Immunhistochemisch wurde hierbei die Produktion von IFN- γ den T-Zellen zugeordnet, IL-10 und IL-12 stammten von Makrophagen (Lin u. a., 1996). Flesch u. a. (1995) zeigten den Zusammenhang zwischen IFN- γ - und IL-12-Produktion auf: *Mycobacterium bovis* infizierte Makrophagen produzierten IL-12, jedoch ausschließlich dann, wenn zuvor rekombinantes IFN- γ in die Zellkultur eingebracht wurde. IL-12 induziert wiederum die IFN- γ -Ausschüttung durch T-Zellen und natürliche Killerzellen (Ma u. a., 1996). Gerosa u. a. (1999) konnten eine gleichzeitige Expression von IL-10 und IFN- γ in Klonen von CD4-positiven Zellen detektieren. Die Klone stammten hierbei aus bronchoalveolären Lavagen von therapienaiven Patienten mit aktiver pulmonaler Tuberkulose ohne eine disponierende Komorbidität wie etwa einer HIV-Infektion. Bei der Untersuchung von auf natürlichem Wege mit MAP infizierten Ziegen mit ausgeprägten histopathologischen Veränderungen detektierten Lybeck u. a. (2013) immunhistochemisch eine hohe lokale

IL-10-Produktion in diffusen granulomatösen Läsionen und Lymphozytenaggregaten, sowie mittels ISH eine lokale IFN- γ -Produktion in granulomatösen Läsionen im Jejunum.

Eine stabile T_H1- oder T_H2-Differenzierung der T-Zellantwort mit Produktion der charakteristischen Zytokine (wie in Abschnitt 1.2.1 auf Seite 3 dargestellt) ist offenbar bei MTB und anderen Mykobakterien nicht zu finden, vielmehr scheint eine Überlappung beider Mechanismen stattzufinden (zusammengefasst in Stabel, 2006). IFN- γ kann das intrazelluläre Wachstum von MAP begrenzen (Zurbrick u. a., 1988). Eine reaktive Hochregulierung von IL-10 könnte eine Folge der durch die proinflammatorischen Zytokine bedingte Entzündung darstellen, gleichzeitig jedoch die Ausbreitung einer mykobakteriellen Infektion begünstigen (O’Garra u. Vieira, 2007; Gerosa u. a., 1999). So konnten Khalifeh u. Stabel (2004) in Gewebeproben von multibazillär infizierten Rindern im klinischen Stadium einer MAP-Infektion mit zahlreichen Läsionen eine höhere IL-10-Produktion nachweisen als in subklinisch betroffenen oder gesunden. Die immunsuppressive Wirkung der IL-10-Sekretion könnte zur Paratuberkulose-typischen chronischen Infektion beitragen (Buza u. a., 2004).

4.1.4. Zytotoxische T-Lymphozyten als mögliche Quelle der Zytokinproduktion

Immunhistochemisch ließ sich in Schnitten, die in direkter Folge zu den für die LMD genutzten angefertigt wurden, MAP mit spezifischer Färbung in allen vier untersuchten Individuen darstellen (siehe Abbildung 3.6 auf Seite 44). In der genaueren Analyse (siehe Abbildung 3.7 auf Seite 45) zeigte sich das spezifisch angefärbte MAP bzw. dessen Bestandteile intrazellulär innerhalb der Submukosa. Eine mögliche Quelle für die mittels LMD und konsekutiver Nukleinsäureanalyse aufgezeigte Zytokin-Überexpression ließ sich mittels Immunfluoreszenz-Färbung von CD8-positiven Zellen aufzeigen, welche sich sehr zahlreich im Präparat direkt subepithelial, als Saum um die infizierten Makrophagen herum, zeigten. Bassey u. Collins (1997) wiesen die Produktion von IFN- γ durch aus dem Serum MAP-infizierten Rinder gewonnener CD8-positiver T-Lymphozyten nach Stimulation mit Mycobacterium avium-Antigenzubereitung nach, während sich in gesunden Kontrollen praktische keine IFN- γ -Ausschüttung messen ließ. Daneben war ebenso durch CD4-positive T-Lymphozyten und periphere Blutmonozyten eine IFN- γ -Produktion bei kranken Rindern zu provozieren.

4.2. LHBs-Expression in der Leber transgener Mäuse

Am Modell der HBV-Protein-transgenen Maus wurde gezeigt, dass ein für eine chronische Hepatitis charakteristischer Schaden allein durch Antigen-Produktion und -Akkumulation entstehen kann, dass also die Be-

eintrüchtigungen der Hepatozytenfunktion bei Hepatitis B offenbar ohne Beteiligung immunologischer Vorgänge verursacht werden kann (Yang u. a., 2008).

4.2.1. Zentrilobuläre Lokalisation von ER-Stress

Bezogen auf das untersuchte Individuum und sämtliche mikrodissezierte Areale scheint die Expression von ATF-3 (3,9-fach) und DDIT-3 (2,2-fach) in Arealen um die Zentralvenen, also perizentral beziehungsweise zentrilobulär (bezogen auf ein Zentralvenen-Läppchen; siehe Abbildung 4.1 auf Seite 59), höher zu sein als periportal. Das deutet darauf hin, dass ER-Stress und die Antwort darauf in den perizentralen Bereichen stärker ausgeprägt ist als in den selektierten periportalaren Arealen.

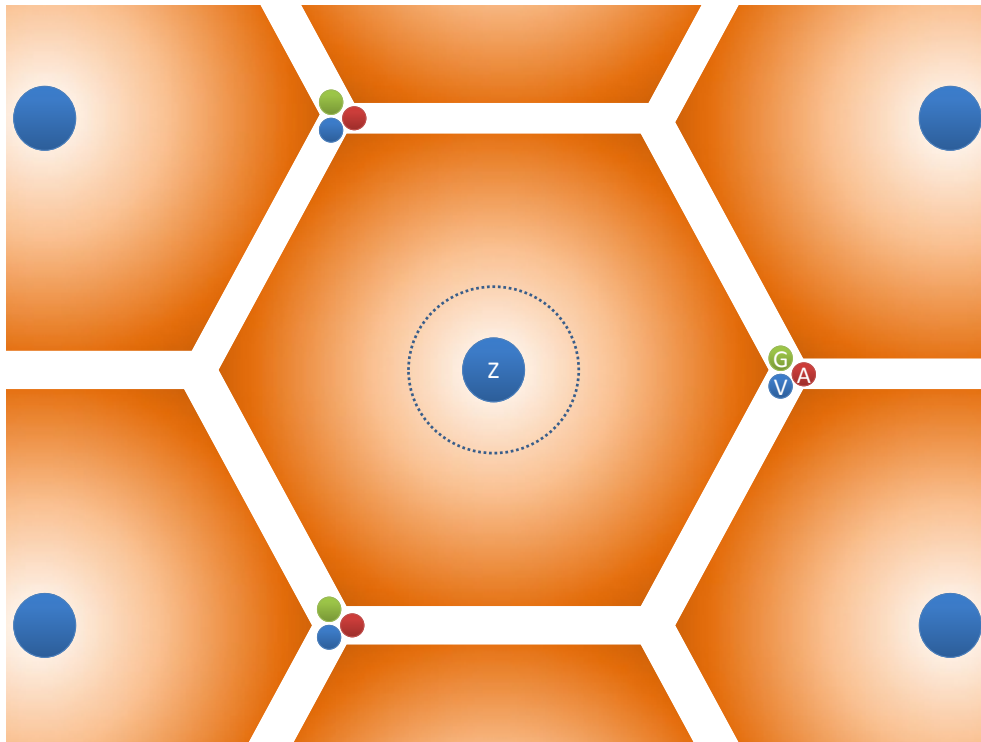


Abbildung 4.1.: Histologischer Aufbau der Leber: Schematisch dargestellt sind mehrere Zentralvenenläppchen mit perizentralem beziehungsweise zentrilobulärem Bereich (innerhalb ...) um die Zentralvene (**Z**), umgeben von mehreren Portalfeldern, jeweils bestehend aus einem Ast der Arteria hepatica (**A**) und Vena portae (**V**), sowie einem Gallengang (**G**). Die Schattierung des Lobulus illustriert das Sauerstoff- und Nährstoffangebot; dieses nimmt - entlang des Blutflusses - von periportal (**kräftiges Orange**) in Richtung perizentral (**blasses Orange**) ab.

Periportale entzündliche Aktivität

Die entzündliche Aktivität spielt sich bei einer HBV-Infektion in der Regel insbesondere im Bereich der Pfortaderäste und Septen ab. In Leberbiopsien von HBsAg-seropositiven Patienten wurde die höchste nekroinflammatorische Aktivität periportal und periseptal verortet ([Jin, Y. M. u. a., 2001](#)). Auch im histopathologischen Beurteilungssystem Histology Activity Index (HAI, [Knodel u. a., 1981](#)) wird die portale und periportale Entzündung beziehungsweise Nekrose in zwei von vier Kategorien abgebildet.

Zentrilobuläre Lokalisation von UPR-Parametern

ER-Stress-assoziierte Parameter wurden dagegen bereits mehrfach experimentell perizentral lokalisiert. So beobachteten [Gilmore u. a. \(2003\)](#) bei der Untersuchung von Auswirkungen der Induktion von Leberentzündung und -schäden bei Mäusen mittels hepatotoxischem Pyrazol immunhistochemisch eine deutlich erkennbare Konzentrationserhöhung von GRP-78 (Glucose regulated protein 78) in perizentralen Hepatozyten. Bei Mäusen, denen Pyrazol verabreicht wurde, fand sich insgesamt im Vergleich zu den Wurfgeschwistern eine höhere Konzentration von GRP-78-Protein und in einer hohen Dosis von 200 mg/kg verabreicht, höhere Alanin-Aminotransferase-Serumwerte im Sinne eines Leberschadens. Auch war zentrilobulär ein Glykogen-Verlust in der Perjud-Schiff-Reaktion erkennbar, der als Hinweis auf oxidativen Schaden gewertet wurde, da Glykogen zur Regeneration von Glutathion dient, das bei oxidativem Stress reduziert wird. Bei GRP-78 (Glucose regulated protein 78; Erstbeschreibung bei [Shiu u. a., 1977](#)), auch als BiP bezeichnet (immunoglobulin heavy chain binding protein; [Haas u. Wabl, 1983](#)) handelt es sich um ein Protein aus der Familie der Hitzeschockproteine (heat shock protein; HSP; [Lim u. a., 2005](#)) von 78.000 Da atomarer Masse, das in Glukose-deprivierter Zellkultur verstärkt synthetisiert wird ([Shiu u. a., 1977](#)). Es zeigt ER-Stress an und ist integraler Bestandteil des UPR ([Lee, 2005](#)). Hinweise auf eine zentrilobuläre Apoptose konnte in Mäusen aufgezeigt werden, denen enteral hohe Mengen Alkohol verabreicht wurden. Hierbei fand sich ebenso eine Hochregulation von GRP-78 und DDIT-3 ([Esfandiari u. a., 2010](#)). Zuvor dokumentierten [Halsted u. a. \(1993\)](#) bereits morphologische Zeichen einer lokalen perizentralen Entzündung bei mit Ethanol gefütterten Mikroschweinen.

GRP-78-Überexpression wurde auch in Hepatitis-B- und Hepatitis-C-assoziiertem HCC nachgewiesen ([Lim u. a., 2005](#) bzw. [Shuda u. a., 2003](#)). Für ersteres halten es [Lim u. a. \(2005\)](#) als Prognosefaktor einsetzbar, der Gefäßeinbrüche und intrahepatische Metastasierung anzeigt. In sechs Monate alten LHB-transgenen-Mäusen war im Vergleich zum Wildtyp GRP-78 auf Proteinebene hochreguliert ([Spano u. a., 2008](#)).

[Gilmore u. a. \(2003\)](#) beobachteten nach Pyrazolverabreichung an Mäu-

se immunhistochemisch ebenfalls eine deutlich erkennbare Konzentrationserhöhung von CYP2A5 (Cytochrom P450, Genfamilie 2, Subfamilie A, Gen 5) in perizentralen Hepatozyten. Global waren mehr CYP2A5-mRNA, -Protein und enzymatische Aktivität vorhanden. CYP2A5 wird der Cytochrom-P450-Familie zugeordnet, es katalysiert zahlreiche Oxidationsreaktionen ([Camus-Randon u. a., 1996](#)) und ist an der Metabolisierung von Karzinogenen wie Nitrosaminen und Aflatoxin beteiligt ([Camus u. a., 1993](#); [Kirby u. a., 1994](#)). Nach durch Chloroform- und Thioacetamid-Verabreichung an Mäuse entstandenem Leberschaden wurde von [Camus-Randon u. a. \(1996\)](#) immunhistochemisch ebenfalls eine dosisabhängige Intensivierung der CYP2A5-Färbung in der zentrilobulären Zone beobachtet. Die CYP2A5-Überexpression wurde bereits in HBV-transgenen Mäusen beobachtet ([Kirby u. a., 1994](#)) und hierbei ebenfalls zentrilobulär verortet ([Chemin u. a., 1996](#)).

Als mögliche Gründe für die in der Literatur und der vorliegenden Arbeit beobachtete zentrilobuläre Lokalisation von ER-Stress-Parametern kommen unter anderem die Folgenden in Frage:

- **Sauerstoff- und Nährstoff-Angebot**

Der ER-Stress könnte in perizentralen Bereichen aufgrund der dort geringeren Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen höher sein als in besser versorgten periportal Anteilen, die von einem direkten Angebot aus V. portae- und A. hepatica-Ästen profitieren (siehe Abbildung 4.1 auf Seite 59; [Ingelman-Sundberg u. a., 1988](#)). Ein vermindertes Sauerstoff-Angebot schränkt durch die Ausbildung eines reduzierenden Milieus im ER die Inhibierung der Disulfidbrückenbildung und damit die Proteinfaltung ein ([Liao u. Hendershot, 2007](#)). Für Zellen aus dem embryonalen Nager-Herz wurde gezeigt, dass Hypoxie die Überexpression von DDIT-3 induziert ([Han, 2005](#)).

- **zentrilobuläre Lokalisation von Cytochromen und Produktion von toxischen Metaboliten**

Die Lokalisation einer chemischen Leberschädigung ist abhängig von Aufnahme und Verteilung der toxischen Agentien und regionspezifischen Expression der metabolisierenden Enzyme ([Baron u. Kawabata, 1983](#)). So nehmen [Camus-Randon u. a. \(1996\)](#) an, dass die Expression von CYP2E1 mit zentrilobulärem Schwerpunkt und die damit verbundene Akkumulation von toxischen Metaboliten für die perizentrale Nekrose nach intraperitonealer Chloroform-Injektion bei Mäusen verantwortlich ist.

Allerdings wird nicht nur bei toxischen Substanzen, sondern auch bei Autoimmunhepatitis bei einem Teil der betroffenen Patienten von zentrilobulärer Nekrose berichtet ([Hofer, 2006](#)).

- **zentrilobulär betonte Akkumulation von Virusbestandteilen**

In transgenen Mäusen, deren Erbgut das komplette HBV-Genom enthält und in denen eine HBV-Replikation stattfindet, wurde zentrallobulär eine höhere Konzentration von HBV-mRNA als anderenorts gefunden. Ebenso war die Expression des HBcAg perizentral stärker ausgeprägt, so dass bei [Guidotti u. a. \(1995\)](#) von einer Virusreplikation in diesem Bereich ausgegangen wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine transgene Maus untersucht, die lediglich für das LBHs transgen ist, die Virusreplikation hiermit keine Rolle spielt.

- **Redistribution hepatischer Enzyme als Folge der Proteinakkumulation**

[Moreau u. a. \(2015\)](#) konnten für HCV-Protein-exprimierende transgene Mäuse und HCV-Patienten eine Dislokation eines wichtigen lipogenetischen Enzyms von der zu erwarteten periportalen Lokalisation in die Lobulusmitte detektieren. Eine Aufhebung der üblichen Distribution der Leberenzyme durch die Proteinakkumulation und damit der funktionellen Zoneneinteilung könnte auch in der vorliegenden Untersuchung Ursache für die beobachtete Verteilung von UPR-Parametern sein.

4.2.2. Einflussfaktoren auf die lokale Verteilung von ER-Stress

Zur genaueren Beschreibung der Verteilung der ER-Stress-Parameter in der Umgebung der Zentralvenen wurde die relative Genexpression von ATF-3 und DDIT-3 mittels quantitativer Real-Time-PCR mit mikrodissiziertem Material aus vier konzentrischen perizentralen Zonen unter Aussparung der unmittelbar periluminalen Anteile ermittelt. Die Zonen hatten hierbei einen identischen Flächeninhalt, Lumen und Endothel wurden entfernt (siehe Abschnitt [2.4.3](#), Seite [31](#)), so dass eine dadurch bedingte Konzentrationsminderung der analysierten RNA-Menge unwahrscheinlich ist. Im Vergleich zwischen den Zonen scheint - in den über drei Wiederholungen des Versuchs gemittelten Werten - sowohl die Expression von ATF-3, als auch die von DDIT-3, in der der Zentralvene am nächsten gelegenen Zone am geringsten zu sein und mit dem Abstand davon zuzunehmen. Das ist ein möglicher Hinweis darauf, dass die Architektur der Leber nicht der einzige Faktor für die beobachtete Verteilung der ER-Stress-Parameter zugunsten der perizentralen Bereiche ist. Wäre ausschließlich das Sauerstoff- und Nährstoffangebot entscheidend für ER-Stress, wäre die höchste relative Genexpression von ATF-3 und DDIT-3 theoretisch in der innersten der vier mikrodisszierten Zone mit 200 µm Durchmesser um die Zentralvene zu erwarten gewesen, in der Entfernung von der Zentralvene absteigend. Das Gegenteil war jedoch der Fall.

4.2.3. Reproduzierbarkeit der Darstellung von ER-Stress in der Immunhistochemie

Immunhistochemisch ließ sich die in der LMD mit konsekutiver RNA-Analyse gefundene Verteilung nachvollziehen. Es fanden sich, sowohl im Fall von ATF-3, als auch für DDIT-3, zahlreiche Zentralvenen mit deutlicher Anfärbung der entsprechenden ER-Stress-Parameter. Nicht jedes zentrilobuläre Areal war stark angefärbt, ebenso war auch vereinzelt in den periportalenen Bereichen eine Anfärbung zu verzeichnen. Das ist entweder auf eine geringere Sensitivität der IHC zurückzuführen oder verdeutlicht, dass die Ergebnisse aus der LMD, gefolgt von RNA-Analyse, lediglich Durchschnittswerte wiedergeben, da über viele mikrodissezierte Areale gemittelt wurde und ist möglicherweise eine Erklärung für die lediglich geringen Unterschiede in der Expression der Parameter.

4.2.4. Optimierung der Laser-Mikrodissektion durch immunhistochemische Identifizierung der Zielareale

Die Ursache des perizentral-betonten ER-Stress ließe sich mittels LMD weiter aufklären. Durch immunhistochemische Identifikation der Zielareale könnten Bereiche anhand funktioneller Aspekte anstatt histomorphologischer Merkmale zur Mikrodissektion ausgewählt werden. Die entsprechende Probenverarbeitung müsste hierzu jedoch an die Voraussetzungen der LMD angepasst werden, insbesondere hinsichtlich der Reduktion der Materialdegeneration und Optimierung der Visibilität nach Dehydratation der Proben.

4.3. Methodenkritik: Laser-Mikrodissektion und konsekutive Nukleinsäureanalyse

Zahlreiche Faktoren haben einen potentiellen Einfluss auf das Ergebnis eines Laser-Mikrodissektions-Versuchs:

- **korrekte Erkennung des Zielareals**

Bei der aufgrund einer bewusst möglichst kurz gewählten Färbedauer und der aufgrund Dehydratation und Lufttrocknung beeinträchtigten visuellen Qualität der gefärbten Gefrierschnitte ist die Morphologie, beispielsweise im Vergleich zu eingedeckten Paraffinschnitten, nicht immer optimal erhalten. Dies erschwert die Selektion von zu vergleichenden Arealen ebenso wie die nicht immer dem modellhaften Aufbau des Organs entsprechende Schnittebene.

- **Qualität und Quantität des Probenmaterials**

Von der Querschnittsfläche der Probe - in der vorliegenden Arbeit Darmwand beziehungsweise Leberanteil - hängt die Menge an möglichen Mikrodissektaten ab. Je häufiger ein zu selektierendes Merkmal (in diesem Fall MAP-positive und -negative Areale beziehungsweise Lebergefäße) auftreten, desto mehr Areale können ausgewählt werden und desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, bei der Analyse intakte Nukleinsäuren vorzufinden.

Zudem spielt die Unversehrtheit der Probe eine entscheidende Rolle. Je langsamer die Probe nach Entnahme eingefroren, je länger sie gelagert, je öfter sie aufgetaut wurde und je länger die Verarbeitung innerhalb des Versuchs dauerte, desto höher ist das Risiko für eine Degradation von Nukleinsäuren.

Nachteile

Zu den Nachteilen der Anwendung von Laser-Mikrodissektion mit konsekutiver Nukleinsäureanalyse in Hinblick auf die vorliegenden Resultate gehören:

- **geringe Anzahl von untersuchten Individuen und Genen**

Der hohe Aufwand hinsichtlich Vorbereitung und die gebotene Eile bei der Versuchsdurchführung erschweren die Untersuchung einer größeren Anzahl von Individuen. Auch ist die Menge der gewonnenen Nukleinsäuren ohne Zwischenschaltung weiterer Amplifikationsmaßnahmen nur gering und nicht ausreichend für die Untersuchung von beliebig vielen Genen.

- **Degradation von Nukleinsäuren**

Aufgrund einer anzunehmenden Degradation von Nukleinsäuren sind möglicherweise die festgestellten Unterschiede größer als mit der verwendeten Methode abgebildet. So könnte beispielsweise die

mRNA-Menge in einem stark exprimierenden Areal im Vergleich zu einem Areal mit weniger oder ohne Expression niedriger gemessen worden sein, da ein Teil der Nukleinsäuren bereits degradiert und nicht mehr messbar geworden sein könnte.

- **Restriktion der Selektionskriterien**

Da die Übertragung von immunhistochemischen Färbemethoden auf die für Laser-Mikrodissektion notwendigen Bedingungen komplex sind, konnten in der vorliegenden Arbeit die interessierenden Areale nur aufgrund vorhandener Autofluoreszenz beziehungsweise mittels Orientierung an in Hämatoxylin-Färbung darstellbaren Strukturen selektiert werden.

- **Untersuchung anhand von Modellen**

Die Resultate haben lediglich eine Aussagekraft hinsichtlich der untersuchten Modelle. Da beispielsweise HBV nur Menschen und Schimpansen befällt ([Tiollais u. a., 1985](#)), ist das Mausmodell der akkumulierenden Antigene eine praktikable Methode hinsichtlich der Verfügbarkeit des Probenmaterials und nicht zuletzt aufgrund der Kontagiosität von HBV.

Vorteile

Dagegen bietet die LMD zahlreiche Vorteile, zu denen folgende gehören:

- **Vielseitigkeit**

Neben einer prinzipiell unbegrenzten Anzahl von Fragestellungen erlaubt die Laser-Mikrodissektion die Bearbeitung von unterschiedlichsten Probematerialien wie festem Material (Paraffin- oder Gefrierschnitte) oder suspendierten Zellen (Blutausstrich oder Zellkultur). Hinsichtlich der nachfolgenden Analyse der Mikrodissektate stehen dem Anwender die Möglichkeit der Analyse von DNA, RNA und/ oder Proteinen offen.

- **geringe Menge an Probenmaterial erforderlich**

Als Ausgangsmaterial genügen theoretisch geringste Mengen von Probenmaterial. [Schütze u. Lahr \(1998\)](#) gelang es Punktmutationen anhand der isolierten mRNA aus einer einzelnen karzinomatösen Zelle nachzuweisen.

- **Ermöglichen von direkten Aussagen**

Die Laser-Mikrodissektion ermöglicht eine Beurteilung hinsichtlich der Funktionsweise einer homogenen Zellpopulation innerhalb ihres Gewebsverbundes.

- **hohe Spezifität**

Durch die gezielte Selektion von speziellen Zellpopulationen erreicht man eine hohe Anreicherung des Analysematerials in entsprechend getrennten Behältnissen.

- **geringe Kontamination**

Da es bei der eigentlichen LMD in der hier durchgeführten Form nicht zu einem mechanischen Kontakt kommt, ist nicht mit einer bedeutenden Veränderung der chemischen Strukturen oder mit Kontamination zu rechnen. Auch können die mittels LMD gewonnenen untersuchten Zellen oder Gewebereinheiten getrennt voneinander untersucht werden. So kann der Nachweis von MAP-DNA (siehe Abschnitt 4.1.1, Seite 56) eindeutig der Darmwand zugeordnet werden, ohne das Risiko der Erfassung luminaler mykobakterieller Bestandteile.

- **quantitative Aussage möglich**

Im Gegensatz zu IHC oder ISH, die eine semiquantitative Beurteilung der vorhandenen Nukleinsäuremenge erlauben, bietet die LMD mit konsekutiver Nukleinsäureanalyse die Möglichkeit der Quantifizierung.

Ausblick

Für weitere Versuche wäre es sinnvoll, einen Prä-Amplifikationsschritt vor der Analyse einzufügen, um so die für die Untersuchung zu Verfügung stehende Nukleinsäuremenge zu vervielfachen und die Bestimmung einer Vielzahl von Zielgenen gleichzeitig zu ermöglichen. So sind theoretisch mit Hilfe der Prä-Amplifikation sogar Micro-Array-Analysen möglich ([Vermeulen u. a., 2009](#)).

4.4. Translationale Bedeutung der Befunde

Im Bereich der Gastroenterologie ist es gelungen für das hepatozelluläre (Ai u. a., 2006), kolorektale (Takahashi u. a., 2014) und das Pankreas-Karzinom (Takadate u. a., 2012) mittels Laser-Mikrodissektion und konsekutiver vergleichender Nukleinsäure- beziehungsweise Proteinanalyse neue diagnostische Biomarker für einen möglichen klinischen Einsatz zu identifizieren.

Hinsichtlich der weiteren Aufklärung bezüglich einer möglichen Assoziation von CED und infektiösen Darmerkrankungen könnte die LMD mit anschließender molekularer Identifikation, Differenzierung und Lokalisierung von Bakterien und deren Bestandteilen von Nutzen sein. Schließlich ist lediglich ein Teil des aktuell im Fokus der Forschung stehenden intestinalen Mikrobioms kultivierbar (Schreiber u. a., 2014) und die Adhärenz beziehungsweise Infiltration der Mukosa und Interaktion mit dem Immunsystem bei CED alteriert (Abreu, 2002). Hier bietet sich die Möglichkeit der regiospezifischen Analyse an.

Nicht nur diagnostische Verfahren lassen sich aus mittels dieser Technik gewonnenen Erkenntnissen ableiten. Ziele für eine gezielte Antikörperbasierte Therapie könnten identifiziert werden. So ließen sich spezifische immunologische Prozesse quantitativ abbilden, die direkt einer beteiligten Gewebsregion zuzuordnen und therapeutisch beeinflussbar wären. Neben den aktuell in Europa für die Morbus-Crohn-Therapie zugelassenen, gegen TNF- α gerichteten Antikörpern Infliximab und Adalimumab (Preiß u. a., 2014) und Biologika wie dem gegen IL-12 und -23 gerichteten Ustekinumab (Settesoldi u. a., 2014) könnten in Zukunft weitere zum Einsatz kommen, eventuell auch solche, die nur bei einer Teilgruppe der Patienten wirksam wäre (Abreu, 2002). Der Einsatz von LMD und konsekutiver Nukleinsäureanalyse, etwa an Biopaten, könnte auch hier zu einer Optimierung und Individualisierung der therapeutischen Optionen beitragen.

Die Bedeutung von Oberflächenproteinen für die HBV-Diagnostik hoben in letzter Zeit Churin u. a. (2015) und Asselah u. Marcellin (2015) hervor. So lässt sich etwa mittels HBsAg-Quantifizierung die Schwere der HBV-bedingten Erkrankung vorhersagen.

Für die Therapie könnte die Klärung der Frage relevant werden, in wie weit zelluläre und nicht immunpathogene Mechanismen im Rahmen einer HBV-Infektion Leberschäden verursachen (Churin u. a., 2015). Bisher steht therapeutisch die Therapie mit Interferon auf immunologischer Ebene, sowie mit Nukleosid-Analoga zur Reduktion der viralen DNA-Synthese im Vordergrund (Seeger u. Mason, 2015). Eine Interventionsmöglichkeit könnte die Inhibition von HSP darstellen, welche als sogenannte Chaperone physiologischerweise bei der Reparatur fehlgefalteter Proteine beteiligt sind (Khalil u. a., 2011). HSP90-Überexpression ist bei HCC-Patienten beschrieben (Sun u. a., 2010) und ist offenbar im Krankheitsverlauf zunehmend (Wu u. a., 2007). Da HBV HSP90 für seine eigene

Produktion benutzt, könnte der HSP90-Inhibitor Geldanamycin therapeutisch genutzt werden, um die Virusreplikation einzuschränken ([Kamal u. a., 2004](#)), und darüber hinaus anti-tumoröse Bedeutung haben ([Kumalo u. a., 2015](#)). Ebenso könnte - ausgehend von der Vorstellung, dass zytopathische Effekt zur Tumorentstehung führen - die Kanzerogenese unterbunden werden indem pre-S-Mutationen therapeutisch beeinflusst werden, welche [Wang u. a. \(2006\)](#) für die Entwicklung von HCC in LHBs-transgenen Mäusen verantwortlich machen. Auch in diesem Bereich könnte die LMD mit konsekutiver Nukleinsäureanalyse eingesetzt werden, um gezielt strukturelle Veränderungen, etwa dysplastische Areale, hinsichtlich der Aufklärung zytopathischer Effekte der viralen Proteinakkumulation zu untersuchen, um so therapeutische Ansatzpunkte abzuleiten.

Kapitel 5.

Zusammenfassung

Mittels Laser-Mikrodissektion und konsekutiver Genexpressionsanalyse wurden Gewebsveränderungen auf zellulärer Basis als Folge einer Infektion mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* bzw. einer Akkumulation von Hepatitis-B-Antigenen untersucht.

MAP löst bei Wiederkäuern die namensgebende Paratuberkulose aus und kann als Teil des *Mycobacterium-avium*-Komplex anhand spezifischer Insertionssequenzen von anderen Subspezies differenziert werden. Das proinflammatorische Zytokin Interferon γ spielt eine entscheidende Rolle bei mykobakteriellen Infektionen, seine Produktion wird durch das ebenfalls proinflammatorische Interleukin 12 verstärkt und durch das antiinflammatorische Interleukin 10 vermindert. In MAP-spezifisch gefärbten mikrodissezierten Arealen innerhalb von Darm-Präparaten infizierter Ziegen konnte die MAP-spezifische IS900-DNA nachgewiesen werden unter Ausschluss des Vorliegens von DNA anderer *M. avium*-Subspezies. Autofluoreszierende Areale innerhalb der Schnitte, am ehesten bedingt durch intrazelluläres Vorliegen von MAP, wiesen eine erhöhte IL-10-, IL-12- und IFN- γ -Expression auf. Die gleichsinnige Veränderung spricht für eine Überlappung pro- und antiinflammatorischer T-Zell-Antwort.

In HBV-infizierten Hepatozyten werden virale Antigene produziert. In transgenen Mäusen, in denen das HBV-Oberflächenprotein LHBs akkumuliert, wird durch die Überlastung des endoplasmatischen Retikulums die „unfolded protein response“ induziert. Bei dieser werden die Transkriptionsfaktoren ATF-3 zur Reduktion der Proteinsynthese und DDIT-3 als Teil eines pro-apoptotischen Signalwegs verstärkt exprimiert. Innerhalb des Präparats einer LHBs-transgenen Maus zeigte sich im Vergleich zwischen mikrodissezierten periportal und perizentralen Arealen eine zentrilobulär höhere Expression von ATF-3 und DDIT-3. Die Mikrodissektion von flächengleichen konzentrischen Zonen ergab eine mit dem Abstand zur Zentralvene zunehmende Expression dieser UPR-Parameter, was impliziert, dass vom Sauerstoffangebot unabhängige Faktoren an der lokalen Ausprägung von ER-Stress beteiligt sind.

Kapitel 6.

Summary

Regional changes in consequence of an infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis or an accumulation of hepatitis B antigens were analyzed by means of laser microdissection and consecutive gene expression analysis.

MAP causes paratuberculosis in ruminants and is part of the *Mycobacterium avium* complex. Subspecies of the MAC can be differentiated using specific insertion sequences. The proinflammatory cytokine interferon γ plays a crucial role in mycobacterial infections. Its production is enhanced by the proinflammatory interleukin 12 and diminished by the antiinflammatory interleukin 10. MAP-specific IS900 DNA was detected in microdissected areas within intestinal specimens of infected goats that were stained specifically for MAP. The presence of DNA of other *M. avium* subspecies could be excluded. Autofluorescent areas within the sections - presumably indicating the presence of intracellular MAP - showed an increased expression of IL-10-, IL-12- and IFN- γ . Concordant changes indicate an overlap of pro- and antiinflammatory T-cell response.

Viral antigens are produced in HBV-infected hepatocytes. The “unfolded protein response” as a result of endoplasmic reticulum stress is induced in transgenic mice where the large HBV surface protein LHBs accumulates. Here the expression of transcription factors ATF-3 and DDIT-3 is enhanced in order to reduce protein synthesis and as part of a pro-apoptotic signaling pathway. Within liver sections of an LHBs-transgenic mouse microdissected pericentral areas showed a higher expression of ATF-3 and DDIT-3 when compared to the periportal zone. Microdissecting concentric zones of equal area revealed an increase in expression of these UPR parameters with greater distance from the central vein. This implicates that factors other than oxygen supply are involved in local distribution of ER stress in LHBs-transgenic mice.

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	acquired immune deficiency syndrome (erworbenes Immundefizienzsyndrom)
APC	antigen presenting cell (Antigen-präsentierende Zelle)
ATCC	american type culture collection (amerikanische Typus-Kultursammlung)
ATF-3	activating transcription factor 3 (aktivierender Transkriptionsfaktor 3)
BiP	immunoglobulin heavy chain binding protein (Immunoglobulin-Schwerketten-Bindungsprotein)
BSA	bovine serum albumine (Rinder-Serumalbumin)
C_T	threshold cycle (Zyklusschwellenwert)
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding protein (Cytidin-Cytidin-Adenosin-Adenosin-Thymidin-Verstärker-bindendes Protein)
CD8	cluster of differentiation 8 (Unterscheidungsgruppe 8)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CHOP	C/EBP homologous protein-10 (C/EBP-homologes Protein 10)
CREB	cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (Zyklisches-Adenosinmonophosphat-Antwort-element-bindendes Protein)
CYP2A5	cytochrome P450 2A5 (Cytochrom P450, Genfamilie 2, Subfamilie A, Gen 5)
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DDIT-3	DNA-damage-inducible transcript 3 (durch DNA-Schaden induzierbares Transkript 3)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
eIF-2	eukaryoter Initiationsfaktor 2
ER	endoplasmatisches Retikulum
F_c -Rezeptor ..	fragment crystallisable-Rezeptor (kristallisierbares-Fragment-Rezeptor)
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
GADD153	growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153 (durch Wachstumsstillstand und DNA-Schaden induzierbares Gen 153)

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRP-78	Glucose regulated protein of 78kDa (Glukose-reguliertes Protein mit 78.000 Da Atommasse)
HAI	histology activity index (histologischer Aktivitäts-Index)
HBcAg	hepatitis B core antigen (Hepatitis-B-Kernantigen)
HBsAg	hepatitis B surface antigen (Hepatitis-B-Oberflächenantigen)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBx	hepatitis B X protein (Hepatitis-B-X-Protein)
HCC	hepatocellular carcinoma (hepatozelluläres Karzinom)
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HSP	heat shock protein (Hitzeschockprotein)
HSP90	heat shock protein 90 (Hitzeshockprotein mit 90.000 Da Atommasse)
IFN- γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5
IL-6	Interleukin 6
IS	Insertionssequenz
ISH	In-situ-Hybridisierung
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LHBs	large hepatitis B surface protein (großes Hepatitis-B-Oberflächenprotein)
LMD	Laser-Mikrodissektion
M-Zelle	Mikrofolien-Zelle
MAA	Mycobacterium avium subspecies avium
MAC	Mycobacterium avium complex (Mykobakterium-avium-Komplex)
MAH	Mycobacterium avium subspecies hominissuis
MAP	Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis
MAS	Mycobacterium avium subspecies silvaticum
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHBs	middle hepatitis B surface protein (mittleres Hepatitis-B-Oberflächenprotein)
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MTB	Mycobacterium tuberculosis
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
oligo-dT-Primer		Desoxythymidin-Oligonukleotid-Primer
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)

PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEN	Polyethylenphthalat
pH	pondus Hydrogenii (Gewicht des Wasserstoffs)
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
r18S	ribosomale RNA von 18 Svedberg
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
SHBs	small hepatitis B surface protein (kleines Hepatitis-"B"-Oberflächenprotein)
TAE	Tris-hydroxymethyl-aminomethan-Acetat-Ethylen-diamin-tetraessigsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
UBS	universal buffer solution (Universalpufferlösung)
UPR	unfolded protein response (Antwort auf ungefaltete Proteine)
UV-C	Bereich C der Ultraviolettstrahlung

Abbildungsverzeichnis

1.1. Prinzip der Laser-Mikrodissektion	2
1.2. Übersicht zur T_H1/T_H2 -Differenzierung von T_H -Zellen .	4
1.3. Replikationszyklus des HBV	7
2.1. Versuchsablauf bei der Mikrodissektion mit Genexpressi- onsanalyse	9
2.2. Ablauf qRT-PCR mit SYBR-Green-Farbstoff	14
2.3. Ermittlung des C_T -Werts	16
2.4. Lasermikrodissektion MAP-positiver und -negativer Area- le zur konsekutiven DNA-Extraktion	19
2.5. Lasermikrodissektion fluoreszenz-positiver und -negativer Areale zur konsekutiven mRNA-Analyse	25
2.6. Verlauf der Lebererkrankung bei HBV-transgenen Mäusen	29
2.7. Lasermikrodissektion periportaler Areale in Hämatoxylin- gefärbten Leber-Gefrierschnitten	31
2.8. Lasermikrodissektion perizentraler Areale in Hämatoxylin- gefärbten Leber-Gefrierschnitten	32
2.9. Lasermikrodissektion konzentrischer perizentraler Areale in Hämatoxylin-gefärbten Leber-Gefrierschnitten	33
3.1. Ergebnis der PCR mit IS-Primern	39
3.2. Spektrophotometrische Messung von cDNA	40
3.3. Expression von IL-10, IL-12 und IFN- γ in den vier unter- suchten Individuen	42
3.4. Expression von IL-10, IL-12 und IFN- γ , gemittelt über vier untersuchte Individuen	42
3.5. IHC: Kolokalisation von Autofluoreszenz und MAP-Färbung	43
3.6. IHC der vier untersuchten Individuen mit MAP-Antikörper	44
3.7. IHC mit MAP- und CD8-Darstellung	45
3.8. ATF-3 und DDIT-3 - perizentral vs. periportal	48
3.9. ATF-3 und DDIT-3 in perizentralen Zonen	52
3.10. ATF-3-Färbung von seriellen Schnitten	54
3.11. DDIT-3-Färbung von seriellen Schnitten	55
4.1. Histologischer Aufbau der Leber	59

Tabellenverzeichnis

2.1. Reaktionsansatz: Reverse-Transkriptase-Reaktion zur Umschreibung von RNA in cDNA	13
2.2. Real-Time-PCR-Programm für Reaktionen mit „Platinum SYBR Green qPCR SuperMix“	13
2.3. Reaktionsansatz: qRT-PCR-Reaktion - Allgemein	15
2.4. Protokoll: IHC-Färbung der jejunalen Gefrierschnitte für die Mikrodisektion mit konsekutiver DNA-Analyse	18
2.5. Reaktionsansatz: PCR mit IS-900-Primer	20
2.6. Reaktionsansatz: PCR mit IS-901-Primer	21
2.7. Reaktionsansatz: PCR mit IS-1245-Primer	22
2.8. Thermocycler-Programm: IS-900 und IS-901	23
2.9. Thermocycler-Programm: IS-1245	24
2.10. Protokoll: Dehydratation der Jejunum-Gefrierschnitte für die Mikrodisektion	24
2.11. Reaktionsansatz: quantitative Real-Time-PCR mit mikrodisezierten Jejunum-Arealen	26
2.12. Real-Time-PCR-Programm für mikrodisezierte Jejunum-Areale	26
2.13. Protokoll: IHC von jejunalen Gefrierschnitten zur MAP- und CD8-Darstellung	27
2.14. Protokoll: kurze Hämatoxylin-Färbung	30
2.15. Protokoll: IHC von Leber-Gefrierschnitten zur ATF-3- beziehungsweise DDIT-3-Darstellung	34
3.1. Spezifität der Insertionssequenzen 900, 901 und 1245 für Mycobacterium-avium-Subspezies	40
3.2. Durchschnittliche C_T -Werte der Proben aus vier Individuen	41
3.3. hepatische ER-Stress-Parameter: Probenanalyse, periportal vs. perizentral	46
3.4. hepatische ER-Stress-Parameter:: Probenanalyse, perizentrale Zonen	49
3.5. Durchschnittliche C_T -Werte der Proben aus vier perizentralen Zonen	50
3.6. Durchschnittliche n-fache Expression von ATF-3 und DDIT-3 über vier perizentrale Zonen	53

Literaturverzeichnis

- [Aaij u. Borst 1972] AAIJ, C. ; BORST, P.: The gel electrophoresis of DNA. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 269 (1972), Nr. 2, S. 192–200
- [Abreu 2002] ABREU, Maria T.: The pathogenesis of inflammatory bowel disease: Translational implications for clinicians. In: *Current Gastroenterology Reports* 4 (2002), Nr. 6, S. 481–489
- [Agdestein u. a. 2012] AGDESTAIN, Angelika ; JOHANSEN, Tone B. ; KOLBJØRNSSEN, Øyvør ; JØRGENSEN, Anne ; DJØNNEN, Berit ; OLSEN, Ingrid: A comparative study of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* in experimentally infected pigs. In: *BMC Veterinary Research* 8 (2012), Nr. 1, S. 11
- [Ahrens u. a. 1995] AHRENS, P. ; GIESE, S. B. ; KLAUSEN, J. ; INGLIS, N. F.: Two markers, IS901-IS902 and p40, identified by PCR and by using monoclonal antibodies in *Mycobacterium avium* strains. In: *Journal of clinical microbiology* 33 (1995), Nr. 5, S. 1049–1053
- [Ai u. a. 2006] AI, Jianhua ; TAN, Yexiong ; YING, Wantao ; HONG, Yi ; LIU, Shuqing ; WU, Mengchao ; QIAN, Xiaohong ; WANG, Hongyang: Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by laser capture microdissection. In: *Proteomics* 6 (2006), Nr. 2, S. 538–546
- [Allen u. a. 1974] ALLEN, W. M. ; PATTERSON, D.S.P. ; SLATER, T. F.: A biochemical study of experimental Johne's disease. In: *Journal of Comparative Pathology* 84 (1974), Nr. 3, S. 391–398
- [Arzumanyan u. a. 2013] ARZUMANYAN, Alla ; REIS, Helena ; FEITELSON, Mark A.: Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. In: *Nature Reviews Cancer* 13 (2013), Nr. 2, S. 123–135
- [Aspinall u. a. 2011] ASPINALL, E. J. ; HAWKINS, G. ; FRASER, A. ; HUTCHINSON, S. J. ; GOLDBERG, D.: Hepatitis B prevention, diagnosis, treatment and care: a review. In: *Occupational Medicine* 61 (2011), Nr. 8, S. 531–540
- [Asselah u. Marcellin 2015] ASSELAH, Tarik ; MARCELLIN, Patrick: Viral hepatitis: towards the eradication of HCV and a cure for HBV. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 35 Suppl 1 (2015), S. 1–3

- [Barnes u. a. 1993] BARNES, P. F. ; LU, S. ; ABRAMS, J. S. ; WANG, E. ; YAMAMURA, M. ; MODLIN, R. L.: Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. In: *Infection and immunity* 61 (1993), Nr. 8, S. 3482–3489
- [Baron u. Kawabata 1983] BARON, Jeffrey ; KAWABATA, Thomas T.: Intratissue Distribution of Activating and Detoxicating Enzymes. In: CALDWELL, John (Hrsg.) ; JAKOBY, William B. (Hrsg.): *Biological Basis of Detoxication*. Academic Press, 1983. – ISBN 978-0-12-155060-8, S. 105–135
- [Barone u. a. 2006] BARONE, Michele ; SPANO, Daniela ; D'APOLITO, Maria ; CENTRA, Marta ; LASALANDRA, Carla ; CAPASSO, Mario ; DI LEO, Alfredo ; VOLINIA, Stefano ; ARCELLI, Diego ; ROSSO, Natalia ; FRANCAVILLA, Antonio ; TIRIBELLI, Claudio ; IOLASCON, Achille: Gene expression analysis in HBV transgenic mouse liver: a model to study early events related to hepatocarcinogenesis. In: *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 12 (2006), Nr. 4-6, S. 115–123
- [Bassey u. Collins 1997] BASSEY, E. O. ; COLLINS, M. T.: Study of T-lymphocyte subsets of healthy and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis-infected cattle. In: *Infection and immunity* 65 (1997), Nr. 11, S. 4869–4872
- [Baumgart u. Sandborn 2012] BAUMGART, Daniel C. ; SANDBORN, William J.: Crohn's disease. In: *The Lancet* 380 (2012), Nr. 9853, S. 1590–1605
- [Berger 2000] BERGER, Abi: Th1 and Th2 responses: what are they? In: *BMJ* 321 (2000), Nr. 7258, S. 424
- [Bielas 2005] BIELAS, J. H.: Non-transcribed strand repair revealed in quiescent cells. In: *Mutagenesis* 21 (2005), Nr. 1, S. 49–53
- [Biet u. a. 2005] BIET, Franck ; BOSCHIROLI, Maria L. ; THOREL, Marie F. ; GUILLOTEAU, Laurence A.: Zoonotic aspects of Mycobacterium bovis and Mycobacterium avium-intracellulare complex (MAC). In: *Veterinary Research* 36 (2005), Nr. 3, S. 411–436
- [Bockman u. Cooper 1973] BOCKMAN, D. E. ; COOPER, M. D.: Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. In: *The American journal of anatomy* 136 (1973), Nr. 4, S. 455–477
- [Boom u. a. 1990] BOOM, R. ; SOL, C. J. ; SALIMANS, M. M. ; JANSEN, C. L. ; WERTHEIM-VAN DILLEN, P M ; VAN DER NOORDAA, J: Boom 1990 Rapid and simple method for purification of RNA and DNA //

- Rapid and simple method for purification of nucleic acids. In: *Journal of clinical microbiology* 28 (1990), Nr. 3, S. 495–503
- [Burgemeister u. a. 2003] BURGEMEISTER, Renate ; GANGNUS, Rainer ; HAAR, Beate ; SCHÜTZE, Karin ; SAUER, Ulrich: High Quality RNA Retrieved from Samples Obtained by Using LMPC (Laser Microdissection and Pressure Catapulting) Technology. In: *Pathology - Research and Practice* 199 (2003), Nr. 6, S. 431–436
- [Bussolati u. Leonardo 2008] BUSSOLATI, G. ; LEONARDO, E.: Technical pitfalls potentially affecting diagnoses in immunohistochemistry. In: *Journal of Clinical Pathology* 61 (2008), Nr. 11, S. 1184–1192
- [Bustin 2000] BUSTIN, S. A.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. In: *Journal of molecular endocrinology* 25 (2000), Nr. 2, S. 169–193
- [Buza u. a. 2004] BUZA, J. J. ; HIKONO, H. ; MORI, Y. ; NAGATA, R. ; HIRAYAMA, S. ; BARI, A. M. ; SHU, Y. ; TSUJI, N. M. ; MOMOTANI, E.: Neutralization of Interleukin-10 Significantly Enhances Gamma Interferon Expression in Peripheral Blood by Stimulation with Johnin Purified Protein Derivative and by Infection with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Experimentally Infected Cattle with Paratuberculosis. In: *Infection and Immunity* 72 (2004), Nr. 4, S. 2425–2428
- [Camus u. a. 1993] CAMUS, A. M. ; GENESTE, O. ; HONKAKOSKI, P. ; BÉRÉZIAT, J. C. ; HENDERSON, C. J. ; WOLF, C. R. ; BARTSCH, H. ; LANG, M. A.: High variability of nitrosamine metabolism among individuals: role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in mice and humans. In: *Molecular carcinogenesis* 7 (1993), Nr. 4, S. 268–275
- [Camus-Randon u. a. 1996] CAMUS-RANDON, A. M. ; RAFFALLI, F. ; BÉRÉZIAT, J. C. ; MCGREGOR, D. ; KONSTANDI, M. ; LANG, M. A.: Liver injury and expression of cytochromes P450: evidence that regulation of CYP2A5 is different from that of other major xenobiotic metabolizing CYP enzymes. In: *Toxicology and applied pharmacology* 138 (1996), Nr. 1, S. 140–148
- [Cheifetz 2013] CHEIFETZ, Adam S.: Management of active Crohn disease. In: *JAMA : the journal of the American Medical Association* 309 (2013), Nr. 20, S. 2150–2158
- [Chemin u. a. 1996] CHEMIN, I. ; TAKAHASHI, S. ; BELLOC, C. ; LANG, M. A. ; ANDO, K. ; GUIDOTTI, L. G. ; CHISARI, F. V. ; WILD, C. P.: Differential induction of carcinogen metabolizing enzymes in a transgenic mouse model of fulminant hepatitis. In: *Hepatology* 24 (1996), Nr. 3, S. 649–656

- [Chemin u. Zoulim 2009] CHEMIN, I. ; ZOULIM, F.: Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma. In: *Cancer Letters* 286 (2009), Nr. 1, S. 52–59
- [Chisari u. a. 1987] CHISARI, F. V. ; FILIPPI, P. ; BURAS, J. ; MCLACHLAN, A. ; POPPER, H. ; PINKERT, C. A. ; PALMITER, R. D. ; BRINSTER, R. L.: Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (1987), Nr. 19, S. 6909–6913
- [Chisari u. a. 1989] CHISARI, F. V. ; KLOPCHIN, K. ; MORIYAMA, T. ; PASQUINELLI, C. ; DUNSFORD, H. A. ; SELL, S. ; PINKERT, C. A. ; BRINSTER, R. L. ; PALMITER, R. D.: Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. In: *Cell* 59 (1989), Nr. 6, S. 1145–1156
- [Chisari u. a. 1985] CHISARI, F. V. ; PINKERT, C. A. ; MILICH, D. R. ; FILIPPI, P. ; MCLACHLAN, A. ; PALMITER, R. D. ; BRINSTER, R. L.: A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. In: *Science (New York, N.Y.)* 230 (1985), Nr. 4730, S. 1157–1160
- [Churin u. a. 2015] CHURIN, Yuri ; RODERFELD, Martin ; ROEB, Elke: Hepatitis B virus large surface protein: function and fame. In: *Hepatobiliary surgery and nutrition* 4 (2015), Nr. 1, S. 1–10
- [Clarke 1997] CLARKE, C. J.: The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. In: *Journal of Comparative Pathology* 116 (1997), Nr. 3, S. 217–261
- [Clarke u. Little 1996] CLARKE, C. J. ; LITTLE, D.: The pathology of ovine paratuberculosis: Gross and histological changes in the intestine and other tissues. In: *Journal of Comparative Pathology* 114 (1996), Nr. 4, S. 419–437
- [Coons 1949] COONS, A. H.: Localization of Antigen in Tissue Cells: II. Improvements in a Method for the Detection of Antigen by Means of Fluorescent Antibody. In: *Journal of Experimental Medicine* 91 (1949), Nr. 1, S. 1–13
- [Coons u. a. 1941] COONS, A. H. ; CREECH, H. J. ; JONES, R. N.: Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. In: *Experimental Biology and Medicine* 47 (1941), Nr. 2, S. 200–202
- [Corman 1989] CORMAN, M. L.: Thomas Kennedy Dalziel 1861–1924. In: *Diseases of the colon and rectum* 32 (1989), Nr. 12, S. 1076–1078
- [Crawford u. a. 2006] CRAWFORD, Dana R. ; OSTROWSKI, Stephanie ; VAKHARIA, Dilip ; ILIC, Zoran ; SELL, Stewart: Separate Origins of

- Hepatitis B Virus Surface Antigen-Negative Foci and Hepatocellular Carcinomas in Transgenic HBsAg (alb/psx) Mice. In: *The American Journal of Pathology* 169 (2006), Nr. 1, S. 223–232
- [Crohn 1932] CROHN, Burril B.: Regional Ileitis. In: *Journal of the American Medical Association* 99 (1932), Nr. 16, S. 1323
- [Dalziel 1913] DALZIEL, T. K.: Chronic Interstitial Enteritis. In: *British Medical Journal* 2 (1913), S. 1068–1070
- [Deben u. a. 2013] DEBEN, Christophe ; ZWAENEPOEL, Karen ; BOECKX, Carolien ; WOUTERS, An ; PAUWELS, Patrick ; PEETERS, Marc ; LARDON, Filip ; BAAY, Marc ; DESCHOLMEESTER, Vanessa: Expression Analysis on Archival Material Revisited. In: *Diagnostic Molecular Pathology* 22 (2013), Nr. 1, S. 59–64
- [Desjardins u. Conklin 2010] DESJARDINS, Philippe ; CONKLIN, Deborah: NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. In: *Journal of Visualized Experiments* (2010), Nr. 1
- [Dieckgraefe u. Korzenik 2002] DIECKGRAEFE, Brian K. ; KORZENIK, Joshua R.: Treatment of active Crohn’s disease with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. In: *The Lancet* 360 (2002), Nr. 9344, S. 1478–1480
- [Edwards 2007] EDWARDS, Robert A.: Laser Capture Microdissection of Mammalian Tissue. In: *Journal of Visualized Experiments* (2007), Nr. 8
- [Emmert-Buck u. a. 1996] EMMERT-BUCK, M. R. ; BONNER, R. F. ; SMITH, P. D. ; CHUAQUI, R. F. ; ZHUANG, Z. ; GOLDSTEIN, S. R. ; WEISS, R. A. ; LIOTTA, L. A.: Laser capture microdissection. In: *Science (New York, N.Y.)* 274 (1996), Nr. 5289, S. 998–1001
- [Esfandiari u. a. 2010] ESFANDIARI, Farah ; MEDICI, Valentina ; WONG, Donna H. ; JOSE, Soumia ; DOLATSHAHI, Maryam ; QUINLIVAN, Eoin ; DAYAL, Sanjana ; LENTZ, Steven R. ; TSUKAMOTO, Hidekazu ; ZHANG, Yue H. ; FRENCH, Samuel W. ; HALSTED, Charles H.: Epigenetic regulation of hepatic endoplasmic reticulum stress pathways in the ethanol-fed cystathionine beta synthase-deficient mouse. In: *Hepatology* 51 (2010), Nr. 3, S. 932–941
- [Feller u. a. 2007] FELLER, Martin ; HUWILER, Karin ; STEPHAN, Roger ; ALTPETER, Ekkehardt ; SHANG, Aijing ; FURRER, Hansjakob ; PFYFFER, Gaby E. ; JEMMI, Thomas ; BAUMGARTNER, Andreas ; EGGER, Matthias: Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn’s disease: a systematic review and meta-analysis. In: *The Lancet Infectious Diseases* 7 (2007), Nr. 9, S. 607–613

- [Flesch u. a. 1995] FLESCHE, I. E. ; HESS, J. H. ; HUANG, S. ; AGUET, M. ; ROTHE, J. ; BLUETHMANN, H. ; KAUFMANN, S. H.: Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. In: *The Journal of experimental medicine* 181 (1995), Nr. 5, S. 1615–1621
- [Gerlich 2013] GERLICH, Wolfram H.: Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. In: *Virology journal* 10 (2013), S. 239
- [Gerosa u. a. 1999] GEROSA, Franca ; NISII, Carla ; RIGHETTI, Stefano ; MICCIOLO, Rocco ; MARCHESINI, Martina ; CAZZADORI, Angelo ; TRINCHIERI, Giorgio: CD4+ T Cell Clones Producing both Interferon-gamma and Interleukin-10 Predominate in Bronchoalveolar Lavages of Active Pulmonary Tuberculosis Patients. In: *Clinical Immunology* 92 (1999), Nr. 3, S. 224–234
- [Gilmore u. a. 2003] GILMORE, W. James ; HARTMANN, Georgy ; PIQUETTE-MILLER, Micheline ; MARRIOTT, Jason ; KIRBY, Gordon M.: Effects of lipopolysaccharide-stimulated inflammation and pyrazole-mediated hepatocellular injury on mouse hepatic Cyp2a5 expression. In: *Toxicology* 184 (2003), Nr. 2-3, S. 211–226
- [Glebe u. Bremer 2013] GLEBE, Dieter ; BREMER, Corinna M.: The molecular virology of hepatitis B virus. In: *Seminars in liver disease* 33 (2013), Nr. 2, S. 103–112
- [Glebe u. Urban 2007] GLEBE, Dieter ; URBAN, Stephan: Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. In: *World journal of gastroenterology* 13 (2007), Nr. 1, S. 22–38
- [Grant u. a. 2002] GRANT, I. R. ; BALL, H. J. ; ROWE, M. T.: Incidence of Mycobacterium paratuberculosis in Bulk Raw and Commercially Pasteurized Cows' Milk from Approved Dairy Processing Establishments in the United Kingdom. In: *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2002), Nr. 5, S. 2428–2435
- [Grünwald 2012] GRÜNEWALD, Wolfgang: *Sample Preparation For Leica Laser Microdissection: Protocol Guide for Leica Microsystems Laser Microdissection Systems*. 1. Wetzlar : Leica Microsystems CMS GmbH, 2012
- [Guidotti u. a. 1995] GUIDOTTI, L. G. ; MATZKE, B. ; SCHALLER, H. ; CHISARI, F. V.: High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. In: *Journal of virology* 69 (1995), Nr. 10, S. 6158–6169
- [Haas u. Wabl 1983] HAAS, I. G. ; WABL, M.: Immunoglobulin heavy chain binding protein. In: *Nature* 306 (1983), Nr. 5941, S. 387–389

- [Hagen u. a. 1994] HAGEN, T. M. ; HUANG, S. ; CURNUTTE, J. ; FOWLER, P. ; MARTINEZ, V. ; WEHR, C. M. ; AMES, B. N. ; CHISARI, F. V.: Extensive oxidative DNA damage in hepatocytes of transgenic mice with chronic active hepatitis destined to develop hepatocellular carcinoma. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (1994), Nr. 26, S. 12808–12812
- [Halsted u. a. 1993] HALSTED, C. H. ; VILLANUEVA, J. ; CHANDLER, C. J. ; RUEBNER, B. ; MUNN, R. J. ; PARKKILA, S. ; NIEMELÄ, O.: Centrilobular distribution of acetaldehyde and collagen in the ethanol-fed micropig. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 18 (1993), Nr. 4, S. 954–960
- [Han 2005] HAN, X.-J.: Involvement of GADD153 and Cardiac Ankyrin Repeat Protein in Hypoxia-induced Apoptosis of H9c2 Cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (2005), Nr. 24, S. 23122–23129
- [Harding u. Boom 2010] HARDING, Clifford V. ; BOOM, W. H.: Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors. In: *Nature Reviews Microbiology* 8 (2010), Nr. 4, S. 296–307
- [Hofer 2006] HOFER, H.: Centrilobular necrosis in autoimmune hepatitis: a histological feature associated with acute clinical presentation. In: *Journal of Clinical Pathology* 59 (2006), Nr. 3, S. 246–249
- [Ingelman-Sundberg u. a. 1988] INGELMAN-SUNDBERG, Magnus ; JOHANSSON, Inger ; PENTTILÄ, Kai E. ; GLAUMANN, Hans ; LINDROS, Kai O.: Centrilobular expression of ethanol-inducible cytochrome P-450 (IIE1) in rat liver. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 157 (1988), Nr. 1, S. 55–60
- [Jiang u. a. 2004] JIANG, H.-Y. ; WEK, S. A. ; MCGRATH, B. C. ; LU, D. ; HAI, T. ; HARDING, H. P. ; WANG, X. ; RON, D. ; CAVENER, D. R. ; WEK, R. C.: Activating Transcription Factor 3 Is Integral to the Eukaryotic Initiation Factor 2 Kinase Stress Response. In: *Molecular and Cellular Biology* 24 (2004), Nr. 3, S. 1365–1377
- [Jin, Y. M. u. a. 2001] JIN, Y. M. ; YUN, C. ; PARK, C. ; WANG, H.-J. ; CHO, H.: Expression of hepatitis B virus X protein is closely correlated with the high periportal inflammatory activity of liver diseases. In: *Journal of Viral Hepatitis* 8 (2001), Nr. 5, S. 322–330
- [Johansen u. a. 2005] JOHANSEN, T. B. ; DJONNE, B. ; JENSEN, M. R. ; OLSEN, I.: Distribution of IS1311 and IS1245 in Mycobacterium avium Subspecies Revisited. In: *Journal of Clinical Microbiology* 43 (2005), Nr. 5, S. 2500–2502

- [Jones u. a. 2006] JONES, P. H. ; FARVER, T. B. ; BEAMAN, B. ; CETINKAYA, B. ; MORGAN, K. L.: Crohn's disease in people exposed to clinical cases of bovine paratuberculosis. In: *Epidemiology and Infection* 134 (2006), Nr. 1, S. 49–56
- [Joshi u. a. 2013] JOSHI, Parul ; SINGH, Mamta ; BHARGAVA, Anudita ; SINGH, Mangal ; MEHROTRA, Ravi: Autofluorescence-an important ancillary technique for the detection of Mycobacterium tuberculosis: Revisited. In: *Diagnostic Cytopathology* 41 (2013), Nr. 4, S. 330–334
- [Kamal u. a. 2004] KAMAL, Adeela ; BOEHM, Marcus F. ; BURROWS, Francis J.: Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. In: *Trends in molecular medicine* 10 (2004), Nr. 6, S. 283–290
- [Kapsenberg 2003] KAPSENBERG, Martien L.: Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. In: *Nature Reviews Immunology* 3 (2003), Nr. 12, S. 984–993
- [Kapuscinski 1995] KAPUSCINSKI, J.: DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. In: *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* 70 (1995), Nr. 5, S. 220–233
- [Katz u. Robison 2002] KATZ, Martin L. ; ROBISON, W.: What is lipofuscin? Defining characteristics and differentiation from other autofluorescent lysosomal storage bodies. In: *Archives of Gerontology and Geriatrics* 34 (2002), Nr. 3, S. 169–184
- [Khalifeh u. Stabel 2004] KHALIFEH, M.S. ; STABEL, J.R.: Upregulation of transforming growth factor-beta and interleukin-10 in cows with clinical Johne's disease. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 99 (2004), Nr. 1-2, S. 39–46
- [Khalil u. a. 2011] KHALIL, Ashraf A. ; KABAPY, Nihal F. ; DERAZ, Sahar F. ; SMITH, Christopher: Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets? In: *Biochimica et biophysica acta* 1816 (2011), Nr. 2, S. 89–104
- [Kidd 2003] KIDD, Parris: Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. In: *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 8 (2003), Nr. 3, S. 223–246
- [Kim u. a. 1991] KIM, Chang-Min ; KOIKE, Kazuhiko ; SAITO, Izumu ; MIYAMURA, Tatsuo ; JAY, Gilbert: HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. In: *Nature* 351 (1991), Nr. 6324, S. 317–320
- [Kirby u. a. 1994] KIRBY, G. M. ; CHEMIN, I. ; MONTESANO, R. ; CHISARI, F. V. ; LANG, M. A. ; WILD, C. P.: Induction of specific cytochrome P450s involved in aflatoxin B1 metabolism in hepatitis B virus transgenic mice. In: *Molecular carcinogenesis* 11 (1994), Nr. 2, S. 74–80

- [Knodel u. a. 1981] KNODELL, R. G. ; ISHAK, K. G. ; BLACK, W. C. ; CHEN, T. S. ; CRAIG, R. ; KAPLOWITZ, N. ; KIERNAN, T. W. ; WOLLMAN, J.: Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 1 (1981), Nr. 5, S. 431–435
- [Kumalo u. a. 2015] KUMALO, Hezekiel M. ; BHAKAT, Soumendranath ; SOLIMAN, Mahmoud E.: Heat Shock Protein 90 (Hsp90) as Anti-cancer Target for Drug Discovery: An Ample Computational Perspective. In: *Chemical Biology & Drug Design* (2015), S. 1131–1160
- [Lanciego u. a. 1997] LANCIEGO, José L. ; GOEDE, Peter H. ; WITTER, Menno P. ; WOUTERLOOD, Floris G.: Use of peroxidase substrate Vector VIP for multiple staining in light microscopy. In: *Journal of Neuroscience Methods* 74 (1997), Nr. 1, S. 1–7
- [Lee 2005] LEE, Amy S.: The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. In: *Methods* 35 (2005), Nr. 4, S. 373–381
- [Lee u. a. 2013] LEE, Yi-Chien ; LU, Ching-Lan ; LAI, Chung-Chih ; TSENG, Yu-Tzu ; SUN, Hsin-Yun ; HUNG, Chien-Ching: Mycobacterium avium complex infection-related immune reconstitution inflammatory syndrome of the central nervous system in an HIV-infected patient: Case report and review. In: *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 46 (2013), Nr. 1, S. 68–72
- [Lefrançois u. a. 2011] LEFRANÇOIS, Louise H. ; PUJOL, Céline ; BODIER, Christelle C. ; TEIXEIRA-GOMEZ, Ana P. ; DROBECQ, Hervé ; ROSSO, Marie-Laure ; RAZE, Dominique ; DIAS, André A. ; HUGOT, Jean-Pierre ; CHACON, Ofelia ; BARLETTA, Raul G. ; LOCHT, Camille ; VIDAL PESSOLANI, Maria C. ; BIET, Franck: Characterization of the Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis laminin-binding/histone-like protein (Lbp/Hlp) which reacts with sera from patients with Crohn's disease. In: *Microbes and Infection* 13 (2011), Nr. 6, S. 585–594
- [Levesque-Sergerie u. a. 2007] LEVESQUE-SERGERIE, Jean-Philippe ; DUQUETTE, Mathieu ; THIBAUT, Catherine ; DELBECCHI, Louis ; BISSONNETTE, Nathalie: Detection limits of several commercial reverse transcriptase enzymes: impact on the low- and high-abundance transcript levels assessed by quantitative RT-PCR. In: *BMC Molecular Biology* 8 (2007), Nr. 1, S. 93
- [Levrero u. a. 2009] LEVRERO, Massimo ; POLLICINO, Teresa ; PETERSEN, Jorg ; BELLONI, Laura ; RAIMONDO, Giovanni ; DANDRI, Maura: Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. In: *Journal of Hepatology* 51 (2009), Nr. 3, S. 581–592

- [Li u. a. 2011] LI, J. ; LIU, Y. ; WANG, Z. ; LIU, K. ; WANG, Y. ; LIU, J. ; DING, H. ; YUAN, Z.: Subversion of Cellular Autophagy Machinery by Hepatitis B Virus for Viral Envelopment. In: *Journal of Virology* 85 (2011), Nr. 13, S. 6319–6333
- [Li u. Holbrook 2004] LI, Ji ; HOLBROOK, Nikki J.: Elevated gadd153/chop expression and enhanced c-Jun N-terminal protein kinase activation sensitizes aged cells to ER stress. In: *Experimental Gerontology* 39 (2004), Nr. 5, S. 735–744
- [Liao u. Hendershot 2007] LIAO, Nan ; HENDERSHOT, Linda M.: Unfolded Protein Response: Contributions to Development and Disease. In: CALDERWOOD, Stuart (Hrsg.): *Cell Stress Proteins* Bd. 7. Springer New York, 2007. – ISBN 978-0-387-39714-6, S. 57–88
- [Lim u. a. 2005] LIM, Seung-Oe ; PARK, Sung-Gyoo ; YOO, Jun-Hi ; PARK, Young-Min ; KIM, Hie-Joon ; JANG, Kee-Taek ; CHO, Jae-Won ; YOO, Byung-Chul ; JUNG, Gu-Hung ; PARK, Cheol-Keun: Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. In: *World journal of gastroenterology : WJG* 11 (2005), Nr. 14, S. 2072–2079
- [Lin u. a. 1996] LIN, Y. ; ZHANG, M. ; HOFMAN, F. M. ; GONG, J. ; BARNES, P. F.: Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. In: *Infection and immunity* 64 (1996), Nr. 4, S. 1351–1356
- [Liu u. a. 2013] LIU, Bo ; WEN, Xin ; HUANG, Canhua ; WEI, Yuquan: Unraveling the complexity of hepatitis B virus: From molecular understanding to therapeutic strategy in 50 years. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (2013), Nr. 9, S. 1987–1996
- [Livak u. Schmittgen 2001] LIVAK, K. J. ; SCHMITTGEN, T. D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (2001), Nr. 4, S. 402–408
- [Lozano u. a. 2012] LOZANO, Rafael ; NAGHAVI, Mohsen ; FOREMAN, Kyle ; LIM, Stephen ; ZHENG, Zhi-Jie ; LOPEZ, Alan D. ; MURRAY, Christopher J. L.: Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. In: *The Lancet* 380 (2012), Nr. 9859, S. 2095–2128
- [Lybeck u. a. 2013] LYBECK, K. R. ; LØVOLL, M. ; JOHANSEN, T. B. ; OLSEN, I. ; STORSET, A. K. ; VALHEIM, M.: Intestinal Strictures,

- Fibrous Adhesions and High Local Interleukin-10 Levels in Goats Infected Naturally with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: *Journal of Comparative Pathology* 148 (2013), Nr. 2-3, S. 157–172
- [Ma u. a. 1996] MA, X. ; CHOW, J. M. ; GRI, G. ; CARRA, G. ; GEROSA, F. ; WOLF, S. F. ; DZIALO, R. ; TRINCHIERI, G.: The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. In: *The Journal of experimental medicine* 183 (1996), Nr. 1, S. 147–157
- [Mabbott u. a. 2013] MABBOTT, N. A. ; DONALDSON, D. S. ; OHNO, H. ; WILLIAMS, I. R. ; MAHAJAN, A.: Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. In: *Mucosal immunology* 6 (2013), Nr. 4, S. 666–677
- [Malhi u. Kaufman 2011] MALHI, Harmeet ; KAUFMAN, Randal J.: Endoplasmic reticulum stress in liver disease. In: *Journal of Hepatology* 54 (2011), Nr. 4, S. 795–809
- [Miranda u. a. 2010] MIRANDA, Kevin C. ; BOND, Daniel T. ; MCKEE, Mary ; SKOG, Johan ; PAUNESCU, Teodor G. ; DA SILVA, Nicolas ; BROWN, Dennis ; RUSSO, Leileata M.: Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. In: *Kidney International* 78 (2010), Nr. 2, S. 191–199
- [Mishina u. a. 1996] MISHINA, D. ; KATSEL, P. ; BROWN, S. T. ; GILBERTS, E. C. ; GREENSTEIN, R. J.: On the etiology of Crohn disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (1996), Nr. 18, S. 9816–9820
- [Möbius u. a. 2008] MÖBIUS, Petra ; HOTZEL, Helmut ; RASSBACH, Astrid ; KÖHLER, Heike: Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: *Veterinary Microbiology* 126 (2008), Nr. 4, S. 324–333
- [Mojsilovic-Petrovic u. a. 2004] MOJSILOVIC-PETROVIC, Jelena ; NESIC, Momir ; PEN, Ally ; ZHANG, Wandong ; STANIMIROVIC, Danica: Development of rapid staining protocols for laser-capture microdissection of brain vessels from human and rat coupled to gene expression analyses. In: *Journal of Neuroscience Methods* 133 (2004), Nr. 1-2, S. 39–48
- [Molodecky u. a. 2012] MOLODECKY, Natalie A. ; SOON, Ing S. ; RABI, Doreen M. ; GHALI, William A. ; FERRIS, Mollie ; CHERNOFF, Greg ; BENCHIMOL, Eric I. ; PANACCIONE, Remo ; GHOSH, Subrata ; BARKEMA, Herman W. ; KAPLAN, Gilaad G.: Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. In: *Gastroenterology* 142 (2012), Nr. 1, S. 46–54

- [Momotani u. a. 2012] MOMOTANI, Eiichi ; ROMONA, Ndanyi M. ; YOSHIHARA, Kazuhiro ; MOMOTANI, Yuriko ; HORI, Masatoshi ; OZAKI, Hiroshi ; EDA, Shigetoshi ; Ikegami, Masahiro: Molecular pathogenesis of bovine paratuberculosis and human inflammatory bowel diseases. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 148 (2012), Nr. 1-2, S. 55–68
- [Moravkova u. a. 2008] MORAVKOVA, M. ; HLOZEK, P. ; BERAN, V. ; PAVLIK, I. ; PREZIUSO, S. ; CUTERI, V. ; BARTOS, M.: Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues. In: *Research in Veterinary Science* 85 (2008), Nr. 2, S. 257–264
- [Moreau u. a. 2015] MOREAU, Marie ; RIVIÈRE, Benjamin ; VEGNA, Serena ; AOUN, Manar ; GARD, Christopher ; RAMOS, Jeanne ; ASSENAT, Eric ; HIBNER, Urszula: Hepatitis C viral proteins perturb metabolic liver zonation. In: *Journal of Hepatology* 62 (2015), Nr. 2, S. 278–285
- [Motiwala u. a. 2006] MOTIWALA, Alifiya S. ; LI, Lingling ; KAPUR, Vivek ; SREEVATSAN, Srinand: Current understanding of the genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. In: *Microbes and Infection* 8 (2006), Nr. 5, S. 1406–1418
- [Mullis u. a. 1986] MULLIS, K. ; FALOONA, F. ; SCHARF, S. ; SAIKI, R. ; HORN, G. ; ERLICH, H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1 (1986), S. 263–273
- [Murakami 2001] MURAKAMI, Seishi: Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. In: *Journal of Gastroenterology* 36 (2001), Nr. 10, S. 651–660
- [Nam u. a. 2002] NAM, Douglas K. ; LEE, Sanggyu ; ZHOU, Guolin ; CAO, Xiaohong ; WANG, Clarence ; CLARK, Terry ; CHEN, Jianjun ; ROWLEY, Janet D. ; WANG, San M.: Oligo(dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly(A) priming during reverse transcription. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2002), Nr. 9, S. 6152–6156
- [Naser 2000] NASER, S.: Isolation of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis from breast milk of Crohn's disease patients. In: *The American Journal of Gastroenterology* 95 (2000), Nr. 4, S. 1094–1095
- [Nguyen u. a. 2009] NGUYEN, V. T. T. ; LAW, M. G. ; DORE, G. J.: Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: epidemiological characteristics and disease burden. In: *Journal of Viral Hepatitis* 16 (2009), Nr. 7, S. 453–463

- [O'Garra u. Vieira 2007] O'GARRA, Anne ; VIEIRA, Paulo: TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. In: *Nature Reviews Immunology* 7 (2007), Nr. 6, S. 425–428
- [Pernthaler u. Amann 2004] PERNTHALER, A. ; AMANN, R.: Simultaneous Fluorescence In Situ Hybridization of mRNA and rRNA in Environmental Bacteria. In: *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2004), Nr. 9, S. 5426–5433
- [Pinkert u. a. 1987] PINKERT, C. A. ; ORNITZ, D. M. ; BRINSTER, R. L. ; PALMITER, R. D.: An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice. In: *Genes & Development* 1 (1987), Nr. 3, S. 268–276
- [Pinto u. a. 2009] PINTO, Fernando L. ; THAPPER, Anders ; SONTHEIM, Wolfgang ; LINDBLAD, Peter: Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. In: *BMC molecular biology* 10 (2009), S. 79
- [Podolsky 2002] PODOLSKY, Daniel K.: Inflammatory bowel disease. In: *The New England journal of medicine* 347 (2002), Nr. 6, S. 417–429
- [Ponnusamy u. a. 2013] PONNUSAMY, Duraisamy ; PERIASAMY, Sivakumar ; TRIPATHI, B.N. ; PAL, Amar: Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis invades through M cells and enterocytes across ileal and jejunal mucosa of lambs. In: *Research in Veterinary Science* 94 (2013), Nr. 2, S. 306–312
- [Preiß u. a. 2014] PREISS, J. C. ; BOKEMEYER, B. ; BUHR, H. J. ; DIGNASS, A. ; HÄUSER, W. ; HARTMANN, F. ; HERRLINGER, K. R. ; KALTZ, B. ; KIENLE, P. ; KRUIS, W. ; KUCHARZIK, T. ; LANGHORST, J. ; SCHREIBER, S. ; SIEGMUND, B. ; STALLMACH, A. ; STANGE, E. F. ; STEIN, J. ; HOFFMANN, J. C.: Aktualisierte S3-Leitlinie—"Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn" 2014. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 52 (2014), Nr. 12, S. 1431–1484
- [Radziwill u. a. 1990] RADZIWILL, G. ; TUCKER, W. ; SCHALLER, H.: Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. In: *Journal of Virology* 64 (1990), Nr. 2, S. 613–620
- [Roderfeld u. a. 2012] RODERFELD, Martin ; KOC, Arzu ; RATH, Timo ; BLÖCHER, Sonja ; TSCHUSCHNER, Annette ; AKINEDEN, Ömer ; FISCHER, Marta ; GERLACH, Susanne v. ; GOETHE, Ralph ; ECKELT, Elke ; MEENS, Jochen ; BÜLTE, Michael ; BASLER, Tina ; ROEB, Elke: Induction of matrix metalloproteinases and TLR2 and 6 in murine colon after oral exposure to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. In: *Microbes and Infection* 14 (2012), Nr. 6, S. 545–553

- [Rosenfeld u. Bressler 2010] ROSENFELD, Greg ; BRESSLER, Brian: Mycobacterium avium paratuberculosis and the etiology of Crohn's disease: a review of the controversy from the clinician's perspective. In: *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie* 24 (2010), Nr. 10, S. 619–624
- [Rumsey u. a. 2006] RUMSEY, John ; VALENTINE, John F. ; NASER, Saleh A.: Inhibition of phagosome maturation and survival of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in polymorphonuclear leukocytes from Crohn's disease patients. In: *Med. Sci. Monit. (Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research)* 12 (2006), Nr. 4, S. 130–139
- [Ryan u. a. 2002] RYAN, P. ; BENNETT, M. W. ; AARONS, S. ; LEE, G. ; COLLINS, J. K. ; O'SULLIVAN, G. C. ; O'CONNELL, J. ; SHANAHAN, F.: PCR detection of Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. In: *Gut* 51 (2002), Nr. 5, S. 665–670
- [Saal u. a. 2003] SAAL, Isabelle ; GUSTIN, Anne ; ROMBAUT, Katia ; PELAEZ, Pilar ; RORIVE, Sandrine ; REMMELINK, Myriam ; SALMON, Isabelle: Laser-assisted microdissection applied to frozen surgical pathologic specimens - methodological aspects on RT-PCR. In: *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology* 3 (2003), Nr. 6, S. 325–335
- [Saiki u. a. 1988] SAIKI, R. K. ; GELFAND, D. H. ; STOFFEL, S. ; SCHARF, S. J. ; HIGUCHI, R. ; HORN, G. T. ; MULLIS, K. B. ; ERLICH, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In: *Science (New York, N.Y.)* 239 (1988), Nr. 4839, S. 487–491
- [Sato u. a. 1998] SATO, K. ; AKAKI, T. ; TOMIOKA, H.: Differential potentiation of anti-mycobacterial activity and reactive nitrogen intermediate-producing ability of murine peritoneal macrophages activated by interferon-gamma (IFN-gamma) and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha). In: *Clinical and Experimental Immunology* 112 (1998), Nr. 1, S. 63–68
- [Schmittgen u. Livak 2008] SCHMITTGEN, Thomas D. ; LIVAK, Kenneth J.: Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. In: *Nature Protocols* 3 (2008), Nr. 6, S. 1101–1108
- [Schreiber u. a. 2014] SCHREIBER, S. ; NIKOLAUS, S. ; ROSENSTIEL, P.: Mikrobiom und Ernährung. Therapie der Zukunft für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen? In: *Der Internist* 55 (2014), Nr. 8, S. 889–897

- [Schütze u. Lahr 1998] SCHÜTZE, Karin ; LAHR, Georgia: Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. In: *Nature Biotechnology* 16 (1998), Nr. 8, S. 737–742
- [Seeger u. Mason 2015] SEEGER, Christoph ; MASON, William S.: Molecular biology of hepatitis B virus infection. In: *Virology* (2015)
- [Selby u. a. 2007] SELBY, Warwick ; PAVLI, Paul ; CROTTY, Brendan ; FLORIN, Tim ; RADFORD-SMITH, Graham ; GIBSON, Peter ; MITCHELL, Brent ; CONNELL, William ; READ, Robert ; MERRETT, Michael ; EE, Hooi ; HETZEL, David: Two-Year Combination Antibiotic Therapy With Clarithromycin, Rifabutin, and Clofazimine for Crohn's Disease. In: *Gastroenterology* 132 (2007), Nr. 7, S. 2313–2319
- [Sellner u. a. 1992] SELLNER, L. N. ; COELEN, R. J. ; MACKENZIE, J. S.: Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. In: *Nucleic acids research* 20 (1992), Nr. 7, S. 1487–1490
- [Settesoldi u. a. 2014] SETTESOLDI, Alessia ; COPPOLA, Manuela ; ROGAI, Francesca ; ANNESE, Vito: Ustekinumab: moving the target from psoriasis to Crohn's disease. In: *Expert review of gastroenterology & hepatology* 8 (2014), Nr. 1, S. 5–13
- [Shiu u. a. 1977] SHIU, R. P. ; POUYSSEGUR, J. ; PASTAN, I.: Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (1977), Nr. 9, S. 3840–3844
- [Shuda u. a. 2003] SHUDA, Masahiro ; KONDOH, Nobuo ; IMAZEKI, Nobuo ; TANAKA, Kenji ; OKADA, Tetsuya ; MORI, Kazutoshi ; HADA, Akiyuki ; ARAI, Masaaki ; WAKATSUKI, Toru ; MATSUBARA, Osamu ; YAMAMOTO, Naoki ; YAMAMOTO, Mikio: Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. In: *Journal of Hepatology* 38 (2003), Nr. 5, S. 605–614
- [Sims-Robinson u. a. 2012] SIMS-ROBINSON, C. ; ZHAO, S. ; HUR, J. ; FELDMAN, E. L.: Central nervous system endoplasmic reticulum stress in a murine model of type 2 diabetes. In: *Diabetologia* 55 (2012), Nr. 8, S. 2276–2284
- [Slana u. a. 2010] SLANA, I. ; KAEVSKA, M. ; KRALIK, P. ; HORVATHOVA, A. ; PAVLIK, I.: Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *M. a. hominissuis* in artificially infected pigs studied by culture and IS901 and IS1245 quantitative real time PCR. In: *Veterinary Microbiology* 144 (2010), Nr. 3-4, S. 437–443

- [Sohal u. a. 2008] SOHAL, J. ; SING, S. ; TYAGI, P. ; SUBHODH, S. ; SINGH, P. ; SINGH, A. ; NARAYANASYMY, K. ; SHEORAN, N. ; SINGHSANDHU, K.: Immunology of mycobacterial infections: With special reference to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. In: *Immunobiology* 213 (2008), Nr. 7, S. 585–598
- [Spano u. a. 2008] SPANO, Daniela ; CIMMINO, Flora ; CAPASSO, Mario ; D'ANGELO, Fulvio ; ZAMBRANO, Nicola ; TERRACCIANO, Luigi ; IOLASCON, Achille: Changes of the Hepatic Proteome in Hepatitis B-Infected Mouse Model at Early Stages of Fibrosis. In: *Journal of Proteome Research* 7 (2008), Nr. 7, S. 2642–2653
- [Stabel 2006] STABEL, J. R.: Host responses to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: a complex arsenal. In: *Animal Health Research Reviews* 7 (2006), Nr. 1-2, S. 61–70
- [Sun u. a. 2010] SUN, Yiyi ; ZANG, Zhihe ; XU, Xiaohong ; ZHANG, Zhonglin ; ZHONG, Ling ; ZAN, Wang ; ZHAO, Yan ; SUN, Lin: Differential proteomics identification of HSP90 as potential serum biomarker in hepatocellular carcinoma by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. In: *International journal of molecular sciences* 11 (2010), Nr. 4, S. 1423–1433
- [Sweeney u. a. 1992] SWEENEY, R. W. ; WHITLOCK, R. H. ; ROSENBERGER, A. E.: *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. In: *Journal of clinical microbiology* 30 (1992), Nr. 1, S. 166–171
- [Takadate u. a. 2012] TAKADATE, Tatsuyuki ; ONOGAWA, Tohru ; FUJII, Kiyonaga ; MOTOI, Fuyuhiko ; MIKAMI, Sayaka ; FUKUDA, Tetsuya ; KIHARA, Makoto ; SUZUKI, Takashi ; TAKEMURA, Taro ; MINOWA, Takashi ; HANAGATA, Nobutaka ; KINOSHITA, Kengo ; MORIKAWA, Takanori ; SHIRASAKI, Keiichi ; RIKIYAMA, Toshiki ; KATAYOSE, Yu ; EGAWA, Shinichi ; NISHIMURA, Toshihide ; UNNO, Michiaki: Nm23/nucleoside diphosphate kinase-A as a potent prognostic marker in invasive pancreatic ductal carcinoma identified by proteomic analysis of laser micro-dissected formalin-fixed paraffin-embedded tissue. In: *Clinical proteomics* 9 (2012), Nr. 1, S. 8
- [Takahashi u. a. 1969] TAKAHASHI, Michiaki ; OGINO, Takeo ; BABA, Koichi: Estimation of relative molecular length of DNA by electrophoresis in agarose gel. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 174 (1969), Nr. 1, S. 183–187
- [Takahashi u. a. 2014] TAKAHASHI, Y. ; SAWADA, G. ; KURASHIGE, J. ; UCHI, R. ; MATSUMURA, T. ; UEO, H. ; TAKANO, Y. ; EGUCHI, H. ; SUDO, T. ; SUGIMACHI, K. ; YAMAMOTO, H. ; DOKI, Y. ; MORI, M. ; MIMORI, K.: Amplification of PVT-1 is involved in poor prognosis via

- apoptosis inhibition in colorectal cancers. In: *British journal of cancer* 110 (2014), Nr. 1, S. 164–171
- [Tiollais u. a. 1985] TIOLLAIS, P. ; POURCEL, C. ; DEJEAN, A.: The hepatitis B virus. In: *Nature* 317 (1985), Nr. 6037, S. 489–495
- [Toracchio u. a. 2008] TORACCHIO, Sonia ; EL-ZIMAITY, HALA M. T. ; URMACHER, Carlos ; KATZ, Seymour ; GRAHAM, David Y.: Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease granulomas. In: *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 43 (2008), Nr. 9, S. 1108–1111
- [Turenne u. a. 2007] TURENNE, C. Y. ; WALLACE, R. ; BEHR, M. A.: Mycobacterium avium in the Postgenomic Era. In: *Clinical Microbiology Reviews* 20 (2007), Nr. 2, S. 205–229
- [Valenzuela u. a. 2002] VALENZUELA, Javier ; SCHMIDT, Clint ; MESCHER, Matthew: The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive CD8 T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 169 (2002), Nr. 12, S. 6842–6849
- [Vavricka u. a. 2010] VAVRICKA, Stephan R. ; BRUN, Lionel ; BALLABENI, Pierluigi ; PITTE, Valérie ; PRINZ VAVRICKA, BETTINA MAREIKE ; ZEITZ, Jonas ; ROGLER, Gerhard ; SCHOEPFER, Alain M.: Frequency and Risk Factors for Extraintestinal Manifestations in the Swiss Inflammatory Bowel Disease Cohort. In: *The American Journal of Gastroenterology* 106 (2010), Nr. 1, S. 110–119
- [Vermeulen u. a. 2009] VERMEULEN, Joëlle ; DERVEAUX, Stefaan ; LEFEVER, Steve ; SMET, Els d. ; PRETER, Katleen d. ; YIGIT, Nurten ; PAEPE, Anne d. ; PATTYN, Filip ; SPELEMAN, Frank ; VANDESOMPELE, Jo: RNA pre-amplification enables large-scale RT-qPCR gene-expression studies on limiting sample amounts. In: *BMC research notes* 2 (2009), S. 235
- [Wang u. a. 2006] WANG, Hui-Ching ; HUANG, Wenya ; LAI, Ming-Der ; SU, Ih-Jen: Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. In: *Cancer science* 97 (2006), Nr. 8, S. 683–688
- [Wang u. a. 1996] WANG, X. Z. ; LAWSON, B. ; BREWER, J. W. ; ZINSNER, H. ; SANJAY, A. ; MI, L. J. ; BOORSTEIN, R. ; KREIBICH, G. ; HENDERSHOT, L. M. ; RON, D.: Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). In: *Molecular and cellular biology* 16 (1996), Nr. 8, S. 4273–4280
- [Weiss u. Souza 2008] WEISS, D. J. ; SOUZA, C. D.: Review Paper: Modulation of Mononuclear Phagocyte Function by Mycobacterium

- avium subsp. paratuberculosis. In: *Veterinary Pathology* 45 (2008), Nr. 6, S. 829–841
- [Whittington u. a. 2012] WHITTINGTON, Richard J. ; BEGG, Douglas J. ; SILVA, Kumudika d. ; PLAIN, Karren M. ; PURDIE, Auriol C.: Comparative immunological and microbiological aspects of paratuberculosis as a model mycobacterial infection. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 148 (2012), Nr. 1-2, S. 29–47
- [Williamson u. Fennell 1975] WILLIAMSON, D. H. ; FENNELL, D. J.: The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA. In: *Methods in cell biology* 12 (1975), S. 335–351
- [Wu u. a. 2007] WU, Xin-Hua ; YAO, Deng-Fu ; SU, Xiao-Qin ; TAI, Bo-Jun ; HUANG, Hua ; QIU, Li-Wei ; WU, Wei ; SHAO, Yi-Xiang: Dynamic expression of rat heat shock protein gp96 and its gene during development of hepatocellular carcinoma. In: *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT* 6 (2007), Nr. 6, S. 616–621
- [Yang u. a. 2008] YANG, Fu ; YAN, Shikai ; HE, Ying ; WANG, Fang ; SONG, Shuxia ; GUO, Yingjun ; ZHOU, Qi ; WANG, Yue ; LIN, Zhongying ; YANG, Yun ; ZHANG, Weidong ; SUN, Shuhan: Expression of hepatitis B virus proteins in transgenic mice alters lipid metabolism and induces oxidative stress in the liver. In: *Journal of Hepatology* 48 (2008), Nr. 1, S. 12–19
- [Yokosuka u. Arai 2006] YOKOSUKA, Osamu ; ARAI, Makoto: Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B. In: *Medical Molecular Morphology* 39 (2006), Nr. 3, S. 113–120
- [Zinszner u. a. 1998] ZINSZNER, H. ; KURODA, M. ; WANG, X. ; BATCHVAROVA, N. ; LIGHTFOOT, R. T. ; REMOTTI, H. ; STEVENS, J. L. ; RON, D.: CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. In: *Genes & development* 12 (1998), Nr. 7, S. 982–995
- [Zurbrick u. a. 1988] ZURBRICK, B. G. ; FOLLETT, D. M. ; CZUPRYNSKI, C. J.: Cytokine regulation of the intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine monocytes. In: *Infection and immunity* 56 (1988), Nr. 7, S. 1692–1697

Anhang A.

Verwendete chemische Stoffe

- 4,6-Diamidin-2-phenylindol; Sigma-Aldrich, Inc.; St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
- Aceton; Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
- Agarose Broad Range (ROTIGAROSE); Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
- AnalaR NORMAPUR Xylol; VWR International S.A.S.; Fontenay-sous-Bois, Frankreich
- β -Mercaptoethanol 99%; Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
- Bovine Serum Albumin; PAA Laboratories GmbH; Pasching, Österreich
- DEPC ≥ 97 %; Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
- di-Natriumhydrogenphosphat; Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
- Essigsäure; Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
- Ethanol absolute; Sigma-Aldrich, Inc.; St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
- Ethanol 96%; Otto Fischar GmbH & Co; Saarbrücken, Deutschland
- Ethidiumbromidlösung 1% (10 mg/ml); Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
- Ethylendiamintetraacetat; Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
- Fluorescent Mounting Medium; Dako North America, Inc.; Carpinteria, Vereinigte Staaten von Amerika
- Gelatin from cold water fish skin; Sigma-Aldrich, Inc.; St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
- Hämatoxylin nach Meyer; Sigma-Aldrich, Inc.; St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika

- ImmPRESS Reagent Kit Peroxidase: Anti-Rabbit Ig; Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, Vereinigte Staaten von Amerika
- Kaliumchlorid; Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
- Kaliumdihydrogenphosphat; Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
- Methanol; Sigma-Aldrich, Inc.; St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
- Normal Horse Serum; Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, Vereinigte Staaten von Amerika
- Pertex mounting medium for coverslipping; Medite; Burgdorf, Deutschland
- RNase Away; Molecular Bio-Products, Inc.; San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
- Sodium chloride; Sigma-Aldrich, Inc.; St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
- TRIS ($C_4H_{11}NO_3$); Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
- Triton X 100; Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
- Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitanmonolaurat); Sigma-Aldrich, Inc.; St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
- Vector Vip Peroxidase Substrate Kit; Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, Vereinigte Staaten von Amerika
- Wasserstoffperoxid 30%; Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland

Anhang B.

Verwendete Antikörper

- CD8 Antibody mouse anti sheep; Clone 38.65 Primärantikörper; AbD serotec; Kidlington, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland
- Goat anti rabbit IgG Alexa 488; Molecular Probes; Eugene, Vereinigte Staaten von Amerika
- Goat anti mouse IgG Alexa 568; Molecular Probes; Eugene, Vereinigte Staaten von Amerika
- Goat pAb Rb IgG Cy 3 Sekundärantikörper; abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland
- MAP-Primärantikörper; Seqlab; Göttingen, Deutschland
- rabbit anti ATF-3; Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Santa Cruz, Vereinigte Staaten von Amerika
- rabbit anti-GADD 153; Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Santa Cruz, Vereinigte Staaten von Amerika

Anhang C.

Verwendete Verbrauchsmaterialien

- 6* DNA Loading Dye; Thermo Scientific; St. Leon-Rot, Deutschland
- Anchored Oligo dT Primers; Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
- Axygen Maxymum Recovery Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl; Abimed GmbH; Langenfeld, Deutschland
- Clear-View Snap-Cap Microtubes 0,6 ml Reaktionsgefäße; Sigma-Aldrich, Inc.; St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
- Cryomold Standard Disposable Vinyl Specimen Molds; Sakura Finetek Europe B.V.; Alphen aan den Rijn, Niederlande
- Deckgläser 22*40 mm; R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik; Emmendingen, Deutschland
- dNTP Set and dNTP Mix, PCR Grade; Qiagen; Hilden, Deutschland
- Fast SYBR Green Master Mix; Life Technologies; Carlsbad, Vereinigte Staaten von Amerika
- GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; Thermo Scientific; St. Leon-Rot, Deutschland
- MembraneSlides; PEN-Membrane 2,0 µm; MicroDissect GmbH; Herborn, Deutschland
- MicroAmp Fast Reaction Tubes; Life Technologies; Carlsbad, Vereinigte Staaten von Amerika
- MicroAmp Optical 8-Cap Strip; Life Technologies; Carlsbad, Vereinigte Staaten von Amerika
- PCR SoftTubes 0,2 ml Reaktionsgefäße; Biozym Scientific GmbH; Oldendorf, Deutschland
- Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG; Life Technologies; Carlsbad, Vereinigte Staaten von Amerika

- Ribonuclease Inhibitor; Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
- Super Frost Ultra plus Microscope Slides; R. Langenbrinck; Emmendingen, Deutschland
- Tissue-Tek O.C.T. Compound; Sakura Finetek Europe B.V.; Alphen aan den Rijn, Niederlande
- TopTaq DNA Polymerase; Qiagen; Hilden, Deutschland

Anhang D.

Verwendete kommerzielle Kits

- RNeasy Plus Micro Kit; Qiagen; Hilden, Deutschland
- Sensiscript RT Kit; Qiagen; Hilden, Deutschland

Anhang E.

Verwendete Primer

Primer (caprin)

- IS-900 forward (5'-gcgatgatcgagcgtctttgg-3'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
- IS-900 reverse (5'-ttcttgaagggtggtcgggcc-3'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
- IS-901 forward (5'-gtctgggattggatgtcctg-3'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
- IS-901 reverse (5'-caccacgtggttagcaatcc-5'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
- IS-1245 forward (5'-gccgccgaaacgatctac-3'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
- IS-1245 reverse (5'-aggtggcgctcgaggaaga-3'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
- IL-10 forward (5'-actaagctgttgctgtcttct-3'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
- IL-10 reverse (5'-gcatgctgttcagttggctcctca-3'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
- IL-12 forward (5'-aatgagagttgcctggcttccaga-3'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
- IL-12 reverse (5'-aatggcctggaactccatgtggta-3'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
- IFN- γ forward (5'-cttgaacggcagctctgagaaact-3'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
- IFN- γ reverse (5'-tttatggcttgcgctggatctgc-3'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
- r18S forward (5'-gtaaccggtgaacccatt-3'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
- r18S reverse (5'-ccatccaatcggtagtagcg-3'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland

Primer (murin)

- GAPDH forward (5'-tgaggaccaggttgtctcct-3'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
- GAPDH reverse (5'-tgtgaggaggatgctcagt-3'); Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland
- Mm_At3_1_SG (ATF-3); Qiagen; Hilden, Deutschland
- Mm_Ddit3_2_SG (DDIT-3); Qiagen; Hilden, Deutschland

Anhang F.

Verwendete DNA-Templates

- BAA-968D-5 (MAP); DNA aus ATCC BAA-968; LGC Standards GmbH; Wesel, Deutschland
- DSMZ No. 44156 DNA (MAA); Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; Braunschweig, Deutschland
- Stamm 04A/1287 DNA (MAH); Friedrich-Loeffler-Institut; Jena, Deutschland

Anhang G.

Verwendete Geräte

- CM1850 UV Kryostat; Leica Biosystems GmbH; Nussloch, Deutschland
- Consort EV243 Power Supply; Sigma-Aldrich; St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
- Coolpix 5400; Nikon; Tokyo, Japan
- Eppendorf Research plus Pipetten 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl; Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
- Filtersatz 44, Anregung BP 475/40, Emission BP 530/50; Carl Zeiss Microscopy; Jena, Deutschland
- Filtersatz 43, Anregung BP 545/25, Emission BP 605/70; Carl Zeiss Microscopy; Jena, Deutschland
- Filtersatz 18, Anregung BP 390-420, Emission LP 450; Carl Zeiss Microscopy; Jena, Deutschland
- FTSS 355-50 Laser; CryLaS GmbH; Berlin, Deutschland
- HBB 2448 Sicherheitswerkbank; Heraeus Holding GmbH; Hanau, Deutschland
- Infinity2 CCD camera; Lumenera; Ottawa, Kanada
- Leitz DMRB Fluoreszenz-Mikroskop; Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland
- LMD6000; Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland
- Mikro 200R Mikrozentrifuge; Andreas Hettich GmbH & Co. KG; Tuttlingen, Deutschland
- MP 4+ Instant Camera System; Polaroid; Concord, Vereinigte Staaten von Amerika
- ND-1000 Spectrophotometer; NanoDrop Technologies, Inc.; Wilmington, Vereinigte Staaten von Amerika
- N HBO 103 Microscope Illuminating System; Carl Zeiss Microscopy; Jena, Deutschland

- Pipetboy; Integra Biosciences AG; Zizers, Schweiz
- Reprostar 3 Beleuchtungseinheit; Muttenz, Schweiz
- StepOnePlus Real-Time PCR System; Life Technologies; Carlsbad, Vereinigte Staaten von Amerika
- T3000 Thermocycler; Biometra; Göttingen, Deutschland
- Vortex Mixer Reagenzglasschüttler; neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH; Heidelberg, Deutschland

Anhang H.

Verwendete Softwareprodukte

- GNU Image Manipulation Program; Version 2.8.2; The GIMP Development Team; Berkeley, Vereinigte Staaten von Amerika
- IBM SPSS Statistics; Version 21.0.0.0; International Business Machines Corp.; Armonk, Vereinigte Staaten von Amerika
- Infinity Capture; Lumenera; Ottawa, Kanada
- Laser Microdissection 6000 System; Version 6.5.0.3104; Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland
- Microsoft Excel 2010; Version 14.0.6129.5000; Microsoft Corporation; Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika
- NanoDrop Measurement Software; Version 3.7.1; Thermo Fisher Scientific; Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
- Step One Software; Version 2.1; Life Technologies; Carlsbad, Vereinigte Staaten von Amerika

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum

Christoph Haas

Danksagung

Bedanken möchte ich mich zuallererst bei Frau Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die engagierte Betreuung.

Herrn PD Dr. rer. nat. Martin Roderfeld danke ich für seine Unterstützung, die aufgebrachte Geduld und seinen Optimismus. Für seine konstruktiven Anmerkungen und Ideen bin ich Herrn Dr. rer. nat. Yury Churin sehr dankbar.

Ein großes Dankeschön richte ich an Frau Annette Tschuschnier für die Einarbeitung in die verwendeten Methoden.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Michael Seimetz und Frau Ingrid Breitenborn-Müller von der benachbarten Arbeitsgruppe möchte ich mich für die technische Unterstützung bedanken.